

Contribution à l'étude
de *Bacillus aurantiacus tingitanus*
(Remlinger et Bailly 1935)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le

19 FEV. 1938

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
Mention « Pharmacie »

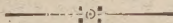
PAR

Claudette-Marie-Odile MARION

née à Remiremont, le 11 Février 1912

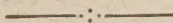
Pharmacien

Diplômée de Microbiologie



COMMISSION D'EXAMEN

MM. LASSEUR, professeur. . .	Président.
le Dr VERNIER . . .	} Juges.
MARCHAL.	



NANCY
SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
1938



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Contribution à l'étude
de *Bacillus aurantiacus tingitanus*
(Remlinger et Bailly 1935)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
Mention « Pharmacie »

PAR

Claudette-Marie-Odile MARION

née à Remiremont, le 11 Février 1912

Pharmacien

Diplômée de Microbiologie

COMMISSION D'EXAMEN

MM. LASSEUR, professeur.	} <i>Président.</i>
le Dr VERNIER . . .	
MARCHAL.	

Juges.

NANCY
SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
1937

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen:

M. PASTUREAU, O , I , .

Assesseur:

M. LASSEUR, , I , .

Professeurs:

MM. DOURIS, I  ,  , 	Toxicologie.
PASTUREAU, O  , I  , 	Pharmacie chimique.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Histoire naturelle.
LASSEUR,  , I  , 	Microbiologie.
N... ..	Matière médicale.
N... ..	Chimie organique.
N... ..	Pharmacie galénique.

Chargés de cours magistraux:

M. MEUNIER	Pharmacie galénique.
Mlle FRANÇOIS.	Matière médicale.
M. KAYSER.	Chimie biologique.

Chargés de cours:

MM. VERNIER, I 	Zoologie.
CORDEBARD,  , I 	Analyse chimique.
DONZELOT, 	Physique. - Chimie minérale.
MARCHAL	Hydrologie.
RICHARD	Chimie organique.

Chefs de travaux:

MM. VERNIER, I 	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD,  , I 	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ, 	Micrographie.
DONZELOT,  (chargé de trav.)	Physique.
RICHARD (chargé de travaux).	Pharmacie.
LASCÈVE (chargé de travaux)..	Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat:

M. TRIBOLET, I  Secrétaire.

Doyens honoraires:

MM. BRUNTZ, O  ,  , I  , O  , 	Recteur de l'Université de Nancy.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Professeur d'Histoire naturelle.

Professeurs honoraires:

MM. GRÉLOT,  , I  , 	
BRUNTZ, O  ,  , I  , O  ,  , 	

Agrégé libre:

M. GIRARDET, , I  Chimie et Toxicologie.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR LASSEUR

A MES PARENTS,

Avant-Propos

Je dois au début de ce travail, adresser une pensée de reconnaissance à Monsieur le Professeur LASSEUR qui a bien voulu m'accueillir en son Laboratoire.

Monsieur le Professeur LASSEUR inspira toutes mes recherches, surveilla lui-même la marche de toutes les expériences, contrôla tous les résultats, m'aida dans leur interprétation.

Monsieur le Docteur VERNIER et Monsieur MARCHAL qui ont toujours été très bienveillants à mon égard, et dont j'ai fréquemment apprécié l'aide efficace, ont accepté de juger cette thèse. Je les en remercie bien vivement.

C'est grâce à Madame LASSEUR que j'ai pu poursuivre l'étude de Bacillus aurantiacus. Je garderai de cette collaboration le meilleur souvenir.

Je ne puis oublier aussi tous mes Camarades du Laboratoire qui jamais n'ont refusé de m'aider lorsque je les en sollicitais.

Monsieur A. SACCHETTI a été pour moi d'une grande complaisance et je l'en remercie.

Introduction

Dans ce travail, je n'ai pas la prétention d'écrire une monographie complète de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935, mais de réunir tous les documents publiés sur cette Bactérie, d'une part, et de contribuer par mes recherches personnelles, d'autre part, à retracer l'histoire du germe chromogène isolé par P. REMLINGER et J. BAILLY.

J'aurais pu consacrer la première partie de ce travail à l'historique et la seconde aux recherches personnelles. Cette façon de faire met plus en évidence le travail de chaque auteur, mais elle a l'inconvénient d'exposer à des redites; aussi, dans la partie consacrée à l'historique, je n'envisagerai que les notes préliminaires de MM. P. REMLINGER et J. BAILLY, me réservant à chacun des autres chapitres, de faire précéder mes recherches personnelles de celles effectuées par d'autres Auteurs sur la question traitée.

Lorsqu'on consulte les anciens traités de Bactériologie, FLÜGGE, EISENBERG, MATZUSCHITA, MIGULA, MACÉ, KOLLE et WASSERMANN, DOPFER et SACQUÉPÉE, on constate que les Bactéries ont été étudiées sous des points de vue différents.

Suivant sa culture et son tempérament, l'Auteur a développé spécialement soit les caractères morphologiques, soit les caractères cultureux, soit le pouvoir pathogène. Même aujourd'hui encore, les Bactéries ne sont pas étudiées d'après un plan adopté par l'ensemble des Bactériologistes du monde, et c'est ce qui présente au point de vue de la diagnose de l'espèce les plus graves difficultés. Pour remédier en partie à ces faits, le Comité Américain, en 1898, et L. GRIMBERT en 1903, ont dressé des listes des épreuves à faire subir à une Bactérie pour mettre en évidence ses diverses fonctions (LASSEUR 1911).

En 1911 LASSEUR insistait déjà sur la nécessité d'une entente internationale qui est maintenant réalisée (1).

(1) Par la publication du *Bergey's manual of determinative Bacteriology* (1923).

Dans cette thèse, j'examinerai donc successivement au cours des premier et second chapitres, l'historique, la place de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY dans la classification et, je justifierai la validité de la création d'une espèce nouvelle. L'influence de l'acide phénique fera l'objet du chapitre III. Au cours du chapitre IV, je résumerai l'aspect des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* en milieu phéniqué.

L'action de la chaleur, l'action de l'oxygène, les caractères de culture en milieux non chimiquement définis, solides (gélatine, gélose, pommes de terre, carottes), liquides (eau peptonée) et en milieux chimiquement définis (milieux synthétiques I et II de LASSEUR), seront développés dans le chapitre V.

La dissociation bactérienne chez *B. aurantiacus tingitanus* sera longuement exposée au cours du chapitre VI.

Dans la seconde partie, j'étudierai les caractères antigènes de *B. aurantiacus tingitanus*. Pour cela, j'envisagerai tout d'abord, la production d'agglutinines des types Ra, Rb, et S, puis je soumettrai les trois types dissociés, à l'action de leurs sérums homologues, ou à celle des sérums obtenus avec les deux autres types de cette Bactérie. La détermination du taux limite d'agglutination et la réaction de saturation de CASTELLANI formeront le chapitre VII.

Les sérums agglutinants décelant des différences entre les trois types dissociés Ra, Rb, S, il était logique de mettre en évidence les différences de stabilité des suspensions obtenues à partir des types Ra, Rb, S, à l'aide de substances moins complexes que les agglutinines : les substances colorantes par exemple, telles que la Fuchsine basique, le Rouge neutre, le Bleu de méthylène, la Safranine, déjà employées dans des conditions analogues par LASSEUR et ses Collaborateurs.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Historique

Le 11 Juillet 1934, le Directeur de l'Institut Pasteur du Maroc, M. P. REMLINGER, adressa à M. le Professeur LASSEUR une souche d'une Bactérie chromogène. La coloration des cultures de cette Bactérie, décrite par P. REMLINGER et J. BAILLY en 1935, sous le nom de *Bacillus aurantiacus tingitanus* est très curieuse.

Le 15 Décembre 1934, P. REMLINGER et J. BAILLY publient dans le « *Maroc Médical*, n° 150 », un article sur « *L'envahissement par les Anguilles des eaux d'alimentation de Tanger* ».

Dans cet article les deux Savants rappellent qu'en 1927, P. REMLINGER avait « déjà attiré l'attention sur la présence de Poissons dans les eaux destinées à l'alimentation des villes et sur les inconvénients qui peuvent en résulter. L'existence des Anguilles dans les canalisations a été tout particulièrement envisagée. Ce sont ces Anguilles qui au printemps et durant l'été de 1934, ont envahi brusquement et massivement les conduites d'eau d'alimentation de Tanger ». En relation avec la présence des Anguilles dans la conduite d'eau tangéroise P. REMLINGER et J. BAILLY ont noté pendant tout l'été 1934 « une élévation sensible du nombre des germes, l'augmentation du titre de COLI, la présence de Bactéries appartenant au groupe des PROTEUS, celle de microbes chromogènes (*Bacillus Violaceus*, *BACILLUS AURANTIACUS TINGITANUS*) voire de Bacille du Pus Bleu ». Ces Bacilles apparaissaient pour la première fois dans l'eau de Tanger, aussi P. REMLINGER et J. BAILLY en concluent-ils que la présence des Poissons dans ces eaux n'est pas indifférente.

L'année suivante, le 18 mai 1935, ces mêmes Savants publient dans les Comptes rendus de la Société de Biologie, tome CXIX, pp. 246-247, une note « *Sur un Bacille chromogène isolé des eaux de Tanger* ».

Ce germe se présente sous l'aspect « d'un Bacille orangé ou même capucine. Il paraît non seulement se rapporter à une espèce nouvelle, mais encore sécréter un pigment fluorescent d'une teinte rarement observée. C'est un Bacille court, à extrémités légèrement effilées mesurant

le plus souvent de 2 à 3 μ , exceptionnellement 5 à 6 μ . Très mobile, il est animé d'un mouvement de translation rapide fréquemment coupé d'une sorte de pirouettement en toupie. Il ne forme pas de spores, mais renferme des espaces clairs non chromophiles tantôt en son milieu, tantôt à une de ses extrémités. Ils lui donnent parfois, surtout dans les vieilles cultures, où les formes d'involution sont du reste peu nombreuses, une apparence de coccobacille. *Bacillus aurantiacus tingitanus* se colore à l'aide de tous les colorants en usage dans les laboratoires et ne prend pas le Gram. Aérobie, il se cultive avec la plus grande facilité à des températures comprises entre + 15° et + 37°. La température eugénésique est + 20°. A partir de + 38°, on n'observe plus aucun développement. Il pousse sur tous les milieux nutritifs et y donne son pigment orangé ou capucine très particulier. Nous citerons les cultures en bouillon, sur gélose (la matière colorante diffuse rapidement dans toute l'épaisseur de ce milieu nutritif), en gélatine (liquéfaction rapide), sur pomme de terre (qui du fait de son inhibition par le pigment prend bientôt l'aspect d'une carotte), en eau peptonée, sur sérum coagulé (pas de liquéfaction), en lait (coagulation tardive), sur betterave, carotte, radis, navet... Nous mentionnerons spécialement la culture sur artichaut, très luxuriante et qui donne un pigment vert émeraude foncé... *B. aurantiacus tingitanus* se développe abondamment sur milieux (non considérés comme nutritifs) bois de figuier ou de néflier du Japon, eau distillée, eau de conduite, urine (particulièrement l'urine de diabétique). Par contre, sur empois d'amidon, mie ou croûte de pain, cellulose, bois de mimosa, olivier, bouillon recouvert de vaseline (anaérobiose relative) on n'observe aucune culture.

Bacillus aurantiacus tingitanus fait fermenter le saccharose, le lactose, le glucose, la mannite, le maltose. En bouillon et dans les conditions eugénésiques il se développe à pH = 6, par contre toujours en bouillon une acidité de pH = 6,2 arrête tout développement. La production du pigment est en rapport avec le rendement de la culture et non avec la réaction du milieu. Elle est la même à l'obscurité et à la lumière. Le pigment diffuse rapidement dans les milieux de culture. Il est insoluble dans l'acétone, l'alcool amylique, l'essence de pétrole, mais il est soluble dans l'éther, l'alcool éthylique. Supposant en raison de sa teinte, que ce pigment pouvait appartenir au groupe des caroténoïdes, nous avons eu recours à M. Erwin CHARGAFF dont on connaît les beaux travaux sur le sujet. Son opinion a été que le dit pigment ressortait à une couleur phénolique ou peut-

être à une anthraquinone ou à une naphthoquinone; mais qu'il n'appartenait pas au groupe du carotène. »

Enfin P. REMLINGER et J. BAILLY rappellent que *B. aurantiacus tingitanus* est dépourvu de toute propriété pathogène.

En 1935, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. BABOU, après avoir rappelé les travaux précédents de P. REMLINGER et J. BAILLY résument les expériences réalisées par eux afin de déterminer les caractères culturels de cette Bactérie. Dans un second mémoire, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY et F. FERRY continuent les expériences réalisées dans le premier mémoire. En 1935, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et J.-G. MARCHAL, étudiant la formation des colonies à partir d'une seule plastide décrivent l'aspect des colonies des différents types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus* sur gélose.

Voyons, tout d'abord, la structure de ces différentes colonies.

Sur gélose, *B. aurantiacus tingitanus* type S, « se développe très rapidement à la température du laboratoire et au bout de 24 heures les colonies mesurent déjà 1 millimètre de diamètre, celles-ci sont rondes, unies, à bords entiers, très peu colorées. A un fort grossissement elles paraissent très finement granuleuses. Après 48 heures de culture, les colonies mesurent 1 mm. 5, elles sont orangées, unies et présentent des bords entiers. A partir de ce moment on constate une croissance rapide des colonies qui restent généralement plates et unies. Quelques fois, elles sont légèrement bombées et, dans ce cas, la partie centrale est riche en pigment orangé. »... (voir Planche I).

« Les colonies de *B. aurantiacus tingitanus* Ra se développent rapidement. Au bout de 24 heures elles mesurent, par exemple, 1,3 millimètre de diamètre et présentent l'aspect dit « en montagne de glace ». La croissance continue et, après 48 heures, les colonies ont un diamètre de 1 mm. 5 à 2 millimètres. Les bords deviennent de plus en plus lobés, les rallonnements s'accroissent dans les parties périphériques, tandis qu'ils s'atténuent vers le centre de la colonie » (voir Planche II).

Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et J.-G. MARCHAL distinguent plusieurs types de *B. aurantiacus tingitanus* Rb, ce sont: Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rb₄.

Les colonies de type Rb₁, après trois jours, « peuvent atteindre au moins 2 millimètres de diamètre. Elles sont colorées en orangé et offrent de nombreux plis. »...

« Dans d'autres cas, (type Rb₂), la colonie est encore rigoureusement

lisse au deuxième jour, ce n'est que vers le troisième jour qu'apparaissent les granulations et les débuts de plissement. Puis les plis s'accroissent avec une grande rapidité et deviennent très saillants. Les bords sont lobés et la colonie est colorée en orangé foncé ».

Ce qui caractérise surtout les colonies du type Rb₃, c'est le fait que même « à un stade très avancé (4 jours) la partie centrale reste individualisée. »

Certaines colonies (Type Rb₄), offrent une évolution différente. « D'abord lisses, elles présentent après 30 heures de nombreux trous. »

Avec chacun des types Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rb₄, les Auteurs ont obtenu « vers le 6^e jour des colonies très orangées, très plissées, mais dont l'arrangement des plissements varie d'un type à l'autre » (voir Planche III).

En 1935, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. BABOU rappellent ces caractères et signalent l'existence autour de certaines colonies jeunes (mesurant de 3 à 5 mm. de diamètre) opaques, lisses et orangées « d'une auréole ou couronne verte, fluorescente, d'une épaisseur de 7 à 8 mm. »

« Quel que soit le type (R ou S) de *B. aurantiacus tingitanus* ensemencé, la liquéfaction de la gélatine est très rapide. »

Sur carotte, *B. aurantiacus tingitanus* offre l'aspect suivant : Les cultures du type S sont blanc jaunâtre, celles du type Ra sont orangées, et celles du type Rb sont orangé foncé. « *B. aurantiacus tingitanus* colore l'artichaut en vert émeraude ou vert foncé. Le coton qui supporte l'artichaut est coloré en orangé sauf dans sa partie supérieure où il est coloré en vert ». En eau peptonée à 2 %, milieu favorable à la végétation de cette Bactérie les cultures de type S « offrent un voile lisse, jaune orangé, la zone liquide sous-jacente est colorée en jaune sur une hauteur de 5 à 6 mm. Le germe se répartit dans toute la masse liquide qu'il trouble uniformément. Les cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Ra sont plus fortement colorées que celles du type S et leur teinte varie du jaune orangé au jaune brun. Le voile paraît lisse. Le trouble du liquide est moins intense qu'avec *B. aurantiacus tingitanus* type S. L'aspect des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb est très différent de celui des deux autres types. Le voile orangé est très plissé. La végétation paraît limitée à la zone superficielle car le liquide semble complètement limpide. Cependant, le pigment ne reste pas localisé dans la région superficielle, il diffuse dans une zone sous-jacente d'environ 5 à 8 millimètres ».

B. aurantiacus tingitanus ne donne pas d'indol, mais réduit les nitrates en nitrites.

« *B. aurantiacus tingitanus* se développe abondamment sur le lait dont il détermine la peptonisation partielle ou totale. La peptonisation est plus intense avec les types Ra et Rb qu'avec le type S. »

L'acide phénique ajouté au milieu nutritif modifie profondément l'aspect des cultures de *B. aurantiacus tingitanus*. On observe « 1° un ralentissement de la végétation pour une zone de concentration comprise entre 0,50 et 0,75 grammes pour 1.000. 2° Un arrêt de la croissance à la concentration de 1 gramme pour 1.000 (dose infertilisante). 3° La mort des plastides à la concentration de 3 grammes pour 1.000 (dose mortelle). »

« Le rouge neutre n'a pas modifié sensiblement le tableau de la vie de *B. aurantiacus tingitanus* tandis que le Bleu de Nil (sulfate) diminue la vitesse de croissance (Concentration 0,8 pour 100) et s'oppose à tout développement de *B. aurantiacus tingitanus* lorsque la concentration atteint 1 gr. 2 ». « La production de pigment diminue à mesure que croît la concentration en chlorure de lithium. C'est ainsi qu'à une concentration égale à 2 pour 100 les cultures sont incolores, et le développement est très faible. A partir d'une concentration de 2 gr. 5 pour 100, toute végétation cesse. Dans les systèmes renfermant 2 pour 100 de chlorure de lithium on observe un raccourcissement des plastides. Ces dernières tendent à prendre une forme ovulaire. On constate aussi une légère exagération de la capsule ».

Dans un deuxième mémoire, « Observations sur la chromogénèse de *B. aurantiacus tingitanus* Remlinger et Bailly ». Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY et F. FERRY étudient l'aspect des cultures de la Bactérie isolée par P. REMLINGER et J. BAILLY, en milieux naturels et synthétiques. « Lorsqu'on cultive *B. aurantiacus tingitanus* en eau peptonée additionnée de différents hydrates de carbone (mannite, glucose, saccharose, lactose, maltose et inuline), on constate que ces substances se comportent différemment dans la production du pigment orangé et du pigment fluorescent. Seuls le saccharose et le glucose favorisent considérablement la production du pigment orangé, et cela aussi bien pour les cultures du type R que pour celles du type S. Enfin, seuls les milieux mannités offrent une belle fluorescence verte »... « Le milieu L₁ favorise surtout la fluorescence et le milieu L₂ la production de pigment orangé. Or, le milieu L₂ diffère du milieu L₁ par la présence de glucose et de succinate d'ammonium... L'arabinose et le lactose ne permettent pas une production sensible de pigment orangé ou fluorescent. Les milieux additionnés soit de lévulose, soit d'inuline, soit de dextrine n'offrent ja-

mais de pigment orangé. Par contre, dans ces liquides nutritifs *B. aurantiacus tingitanus* donne une fluorescence verte. C'est avec le lévulose que l'on obtient la plus belle fluorescence verte. En présence de saccharose, galactose, maltose et mannite, on n'observe que de faibles colorations jaune orangé, la quantité de pigment vert fluorescent formé varie avec le glucide considéré. La glycérine se différencie des substances précédentes en ce sens que les jeunes cultures en milieu glyciné sont très peu colorées, par contre, les vieilles cultures montrent une assez belle coloration orangée. Quant à la fluorescence, elle est surtout perceptible vers le 8^e jour de culture. Enfin, le glucose favorise tout particulièrement la production du pigment orangé... D'une façon générale, la fluorescence est surtout visible dans les systèmes alcalins... L'asparagine favorise la production du pigment orangé. Le pigment fluorescent est surtout abondant dans les cultures qui ne renferment que du succinate d'ammonium. On peut d'ailleurs exalter la production de la fluorescence en effectuant des passages répétés sur milieu additionné de succinate d'ammonium... En présence de glucose, les cultures de type Rb donnent un voile et un liquide limpide tandis qu'en présence de saccharose, les cultures de type Rb sont troubles comme celles du type S... L'apparition du pigment orangé ou fluorescent correspond à un accroissement du pH. La fluorescence verte peut s'observer dans des milieux de pH de l'ordre de 6,2; 6,3; 6,5. Le pH de la zone supérieure d'une culture peut être très différent de celui de la couche profonde et cela, quels que soient le milieu nutritif et le type bactérien expérimenté... Les couches de liquide où l'oxygène pénètre le plus facilement sont les zones à grande transformation des aliments azotés ou hydrocarbonés... En présence de glucose, il y a acidification par les trois types Ra, Rb, S. Dans les milieux additionnés de lévulose, on assiste au contraire à l'accroissement du pH quel que soit le type bactérien utilisé ». Dans les cultures effectuées en présence de colorant, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY et F. FERRY établissent une relation entre le potentiel d'oxydo-réduction et l'intensité de la transformation des aliments. Ces auteurs montrent en outre, que « Les produits de transformation diffusent lentement (différence de pH dans les couches superficielles et profondes) mais leur diffusibilité est incontestable (différence de pH des milieux non ensemencés et des couches profondes des cultures) ».

CHAPITRE II

Nécessité d'une espèce nouvelle

La Bactériologie est de création bien récente, quand on la compare aux sciences rationnelles (Mathématiques, Physique, Chimie). Cependant, depuis les travaux de COHN (1872), ZOPF (1880-1885), FLÜGGE (1886), HUEPPE (1886), la technique microbiologique s'est perfectionnée, mais parallèlement à ces progrès, le nombre des espèces bactériennes décrites a augmenté considérablement. *Bakteriologische Diagnostik* de EISENBERG ne faisait appel qu'à quinze attributs pour caractériser une espèce bactérienne. On ne saurait nier les services qu'a pu rendre cette publication aux Bactériologistes, il en est peu qui ne la consultent, mais il faut bien reconnaître qu'elle a rendu plus de services, de 1889 à 1902, qu'elle n'en rend de nos jours.

S'inspirant très certainement du *Bakteriologische Diagnostik* de EISENBERG, MATZUSCHITA publie, en 1902, son *Bakteriologische Diagnostik*, dans lequel les germes sont classés en faisant appel à un nombre tout aussi restreint de caractères. Il ne faut donc pas s'étonner si certains Auteurs ont rencontré des difficultés énormes à identifier un germe, nouvellement isolé, avec les formes décrites dans la littérature bactériologique. Si l'on ajoute à cela la plasticité particulière, on peut même dire extraordinaire des Bactéries, (organismes qui sont en contact direct avec le milieu de culture, sans autre écran protecteur que leur membrane) on conçoit qu'un Savant et non des moindres, ait tout d'abord pensé à nier l'espèce en Bactériologie.

Ces réserves (1) étant faites, il faut aborder le problème de la place

(1) LASSEUR, qui dans de nombreuses publications a précisé sa conception personnelle sur la classification en Bactériologie, rappelait tout récemment, en 1936, les vicissitudes de la classification bactériologique. (Trav. Lab. Microbiol. Fac. Phar., Nancy, f. 1X, 1936.)

que doit occuper *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935, dans la classification.

Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. BABOU, tenant simplement à justifier la formation d'une espèce nouvelle, ont rapproché la Bactérie isolée par REMLINGER et BAILLY de *Bacillus fluorescens aureus* ZIMMERMANN, 1880 et de *Bacillus aurantiacus*, Gr. et P. FRANKLAND, 1887.

Sur les conseils de mon maître, Monsieur le Professeur LASSEUR, j'ai recherché dans la littérature tous les Bacilles chromogènes présentant des caractères communs avec *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935.

C'est ce qui résulte de l'examen du Tableau I où j'ai résumé les caractères essentiels, du moins d'après les données de la littérature, de treize Bactéries chromogènes (1).

(1) Certains germes sont décrits avec un luxe de détails impressionnants et sont l'objet de mémoires extrêmement importants; tels par exemple les germes pathogènes d'une façon générale, et quelque; espèces saprophytes (*B. chlororaphis*, *B. caryocyaneus*.)

Désignation des Germes	Forme et dimensions	Motilité	Aspect des cultures sur gélatine
<i>B. aurantiacus</i> Gr. et P. Frankland, 1889.	bâtonnets unis en diplo ou en fila- ments, et mesu- rant 1 μ , 7 sur 0 μ , 85;	peu mobile par fouets péritriches;	pas de liquéfaction; culture jaune rangé clair;
<i>B. aurantii</i> Viron, 1892.	petits bâtonnets al- longés, unis en di- plo;		
<i>B. aureus</i> Gr. et P. Frankland, 1887.	bâtonnets unis en fi- laments;		faible liquéfaction; culture jaune rangé foncé;
<i>B. ochraceus</i> Zim- mermann, 1890.	plastides à extrémi- tés arrondies, me- surant 1 μ , 25 à 4 μ , 5 sur 0 μ , 65 à 0 μ , 75;	mobile par fouets polaires;	liquéfaction, culture variant du jaun pâle au jaun ocre;
<i>B. chlorinus</i> Tata- roff, 1891.	bacille mesurant 1 μ , 75 de lon- gueur;	mobile;	liquéfaction, colon à centre jaun bords verdâtres;
<i>B. chromo-aromati- cus</i> , Galtier, 1891	bâtonnets courts;	mobile;	liquéfaction, cultu variant du jaun au jaune orang odeur aromatique;
<i>B. aureus liquefa- ciens</i> , Matzuchi- ta, 1902.	bâtonnets courts;		liquéfaction lent culture variant jaune or au jaun orangé;
<i>B. fluorescens me- sentericus</i> , Tata- roff, 1891.	bâtonnets mesurant 2 μ , 5 à 3 μ , 5 sur 6 μ à 7 μ ;	mobile;	liquéfaction, cultu variant du verd tre au jaune cla odeur aromatique;
<i>B. chlorophaenus</i> .	plastide ellipsoïdale, mesurant 1 μ , 5 à 3 μ sur 0 μ , 8;	mobile;	liquéfaction;
<i>B. ochroleucus</i> 1893	bâtonnet mesurant 1 μ , à 1 μ , 5 sur 0 μ , 5;		liquéfaction, cultu jaunâtre;
<i>B. fluorescens ful- vus</i> .	plastide ovulaire, mesurant 0 μ , 75 à 1 μ , 5 sur 0 μ , 5;	très mobile;	pas de liquéfaction; culture jaune flu rescente;
<i>Pseudomonas capsu- lata</i> , Migula, 1896	plastides à extrémi- tés arrondies, en- capsulées, mesu- rant 1 μ à 1 μ , 5 sur 0 μ , 8 à 1 μ ;	mobile;	pas de liquéfaction; culture brunâ avec fluorescence verte;
<i>B. fluorescens au- reus</i> , Zimmermann, 1890.	bâtonnets isolés ou en diplo, mesu- rant 0 μ , 74 sur 1 μ , 48;	très mobile;	pas de liquéfaction; culture jaune av fluorescence ve

Remarque. — Les dimensions qui figurent dans ce tableau sont celles relevées dans la littérature; mais à de rares exceptions près, les Auteurs n'ont pas spécifié s'il s'agissait de matériel vivant ou de matériel coloré.

Le quelques germes chromogènes.

Aspect des cultures sur gélose	Aspect des cultures sur pommes de terre	Pigment	Fluorescence
enduit orangé lisse;	enduit rouge oran- gé épais;	jaune orangé;	
enduit jaune oran- gé, plissé;		jaune or, soluble dans l'eau, l'al- cool éthylique, in- soluble dans l'al- cool méthylique; jaune or, insoluble dans l'eau, solu- ble dans tous les solvants;	
enduit jaune ocre;	enduit mince, jaune ocre;	jaune ocre;	
enduit clair deve- nant jaune brun;	enduit crémeux, jaune;	jaune verdâtre;	
enduit jaune, humi- de;	enduit orangé;	brun et vert;	
enduit humide, jau- ne;	enduit orangé;	jaune orangé;	
enduit bleu vert;	enduit brun café;		verte;
		brunâtre;	verte;
enduit jaune;	enduit jaune;	jaune ocre;	
enduit jaune et fluorescence verte;	enduit jaune brun;	jaune;	verte;
enduit fluorescent gris vert;	enduit variant du gris vert au brun jaunâtre;		verte;
enduit variant du jaune ocre au jaune or;	enduit variant du jaune ocre au jaune or;	jaune;	verte;

J'aurais tenu à comparer les pouvoirs fermentatifs des différents germes examinés, notamment l'action des Bactéries sur les glucides (1).

En 1880, VAN TIEGHEM décrivait déjà deux espèces de Bactéries vertes : *Bacterium viride* et *Bacillus virens*; 29 années plus tard, BILLIARD et DANGEARD étudient d'une façon approfondie la biologie de *Bacillus virescens* (DANGEARD 1909) et de *Bacillus viridescens* (BILLIARD 1909).

Les éminents Biologistes avaient surtout en vue de découvrir une analogie entre le rôle des pigments bactériens, dans le métabolisme des Bactéries et le rôle de la chlorophylle chez les végétaux supérieurs. De ce fait, on ne trouve pas dans la littérature d'éléments suffisants pour rapprocher, avec quelque certitude, la Bactérie verte de DANGEARD du Germe isolé par REMLINGER et BAILLY.

Et même au point de vue pigment, des différences considérables persistent. Il est vrai que *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY type S produit un pigment jaune et une fluorescence verte, mais le type R fabrique un pigment orangé qui se trouve éloigné du pigment jaune verdâtre ou vert de *B. virescens* DANGEARD et *B. viridescens* BILLIARD.

Il est d'autres Germes, tel *B. chlororaphis* que l'on peut à coup sûr différencier de *B. aurantiacus tingitanus*, bien que le Germe isolé par Ph. LASSEUR produise à certains moments un pigment orangé à l'exclusion de tout autre corps coloré. L'établissement de la formule de constitution de la chlororaphine et la synthèse de ce pigment permettent de caractériser avec rigueur *Bacillus chlororaphis*.

Dans le tableau ci-dessous j'ai donc négligé de faire intervenir *B. viridans* SYMMERS, *B. virescens* DANGEARD, *B. viridescens* BILLIARD, *B. chlororaphis*, parce que les uns s'éliminent faute de documents et que les autres se détachent par leurs caractères différentiels.

Je n'ai également fait figurer dans cette nomenclature que des Bactéries pouvant produire des pigments orangés, jaunes ou verts. J'ai laissé de côté les Bactéries qui donnent une matière colorée bleue ou violette, (ex. *B. caryocyaneus*) ainsi que *B. aureus* PANSINI et *B. fluorescens longus* ZIMMERMANN. Ces derniers Germes sont sporogènes et de plus ils se colorent par la méthode de GRAM.

J'ai été amenée à supprimer les caractères qui n'étaient signalés que

(1) Dans un tableau de différenciation P. HAUDUROY, HÉRINGER, GUYOT, G. MAGROU et URBAIN (1937) ont fait un large appel aux Bactéries de fermentation; l'emploi de 3 à 4 milieux sucrés permet dans la majorité des cas d'identifier les Bactéries ne se colorant pas par la méthode de GRAM,

pour quelques espèces. Ainsi la coagulation du lait n'était décrite que chez deux germes et la production d'hydrogène sulfuré n'a été signalée que pour *B. chlororaphis* et *B. ochraceus* ZIMMERMANN.

Si *Pseudomonas capsulata* MIGULA et *B. ochraceus* ZIMMERMANN arrivent à libérer l'indol du tryptophane, l'indol n'a pas été mis en évidence dans les cultures de *B. aurantiacus* Gr. et P. FRANKLAND. De plus, l'aspect des cultures en bouillon n'étant pas spécifique a été omis. Seul *B. aurantiacus* Gr. et P. FRANKLAND réduirait les nitrates en nitrites. De même le pouvoir pathogène, n'ayant été décrit que chez *B. fluorescens mesentericus* TATAROFF (1), ne figure pas dans le tableau.

L'étude comparative des caractères des 13 Germes ci-dessus permet de conclure en première approximation que seuls *B. aurantiacus* Gr. et P. FRANKLAND et *B. fluorescens aureus* ZIMMERMANN doivent être comparés d'une façon approfondie à *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935.

Ces trois Germes sont opposés dans le tableau suivant.

(1) *B. fluorescens mesentericus* TATAROFF est pathogène pour le Lapin.

TABLEAU II

Résumé des caractères différentiels
de *B. aurantiacus* Gr. et P. FRANKLAND, 1889
B. fluorescens aureus ZIMMERMANN, 1890
B. aurantiacus tingitanus REMLINGER et BAILLY, 1935.

	<i>B. aurantiacus</i> Gr. et P. Frankland (1889)	<i>B. fluorescens</i> <i>aureus</i> Zimmermann (1890)	<i>B. aurantiacus</i> <i>tingitanus</i> Remlinger et Bailly (1935)
Liquéfaction de la gélatine	pas de liquéfaction;	pas de liquéfaction;	Liquéfaction;
Aspect des cultures sur gélose	enduit orangé, lisse;	enduit variant du jaune ocre au jaune or;	Enduit orangé, fluorescence verte.
Aspect des cultures sur pomme de terre	enduit rouge orangé, épais	enduit variant du jaune ocre au jaune or;	Enduit rouge orangé;
Dimensions exprimées en μ		0,74 sur 1,48	Type S long. 1,35, Type Rb long. 1,27;
Fouets	péritriches;		
Indol	pas d'indol		Pas d'indol;
Aspect des cultures en bouillon	voile orangé, dépôt orangé;	voile jaune, trouble;	
Pigment	jaune orangé;	jaune;	
Fluorescence		verte;	Verte;

En première approximation *B. aurantiacus* Gr. et P. FRANKLAND ne pousse pas en milieu acide. Ce germe se différencie donc de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY.

Mais il ne faut pas oublier, qu'en 1889, il n'était pas question de déterminer l'ordre de grandeur de la concentration en ions Hydrogène. Cependant il y a tout lieu de croire, que par milieu acide, Gr. et P. FRANKLAND entendaient des milieux de l'ordre de $\text{pH} = .3$. De l'étude comparative de ces 8 caractères on peut déduire que P. REMLINGER et J. BAILLY eurent raison de créer une espèce nouvelle pour désigner *B. aurantiacus tingitanus*.

CHAPITRE III

Influence de la tension superficielle sur le tableau de la vie de *B. aurantiacus tingitanus*

Historique

Dans un mémoire paru en 1932 dans les « *Archiv für Mikrobiologie* », Ph. LASSEUR, P. VERNIER, A. DUPAIX et L. GEORGES, étudient l'influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des Bactéries, en milieu synthétique et en solution peptonée; au début de cet article, les Auteurs mentionnent la littérature antérieure à 1932, ayant trait à cette question. C'est la raison pour laquelle, dans les lignes qui suivent, je rappellerai seulement les travaux postérieurs à 1932 (1).

En 1932, G. MAZZETTI consacre un article aux modifications du pouvoir antiseptique du bichlorure de mercure, de l'acide salicylique et de l'acide phénique, lorsque varie la tension superficielle des milieux auxquels ces substances sont ajoutées.

D. BOVET et L. DEMANCHE, en 1933, étudient l'action antiseptique de 3 isomères (nitroéthylène-di-amino quinoléine) dont les pouvoirs antiseptiques varient dans le rapport de 1 à 100 ou 10.000. Les Auteurs ont pensé à rattacher ces faits à une variation de la tension superficielle.

(1) A. BOUTARIC dans son bel article du *Journal de Chimie Physique* (t. XXXI, 1934; pp. 621-634), étudie le coefficient de variation thermique de la tension superficielle des liquides.

De même KOPACZEWSKI, en 1933 et 1935 publie un rapport, puis une note, sur le rôle de la tension superficielle en Biologie et sur la tension superficielle des substances cancérogènes. Enfin la tension superficielle comparée des sérums maternel et foetal a été étudiée par GUINARD et RICHARD en 1934.

On peut se demander, en effet, si l'action antiseptique des produits susceptibles d'abaisser la tension superficielle ne serait pas due « *au fait qu'un corps en solution qui a le pouvoir de diminuer la tension superficielle se concentre aux surfaces de séparation, donc à la surface des Bactéries en suspension (formule thermodynamique de GIBBS)* » (Daniel BOVET et Lucie DEMANCHE, 1933).

En 1934, Georges BLANC et Bernard DELAGE font agir la bile sur des « *virus typhiques* ». Enfin, en 1936, Ph. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR, reprenant leurs travaux sur le déplacement des Bactéries à la surface des gelées nutritives (1) montrent l'influence d'une substance tensio-active sur la forme d'une colonie. L'apport de cristaux de camphre au voisinage d'une colonie bactérienne animée de mouvement en modifie considérablement la forme.

Il était donc logique de cultiver *B. aurantiacus tingitanus* sur milieux liquides et sur milieux solides additionnés de substances tensio-actives : glycocholate de soude, taurocholate de soude.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

Les milieux solides ou liquides utilisés au cours de ces expériences sont les suivants :

1° Solution peptonée à 2 %, gélosée à 3 %, à laquelle on ajoute 0,25 ou 0,50 ou 1 % de taurocholate de soude.

2° Solution peptonée à 2 % additionnée de 0,25 ou 0,50 ou 1 % de taurocholate de soude ou de glycocholate de soude.

1° Culture en milieux solides.

L'ensemencement de ces milieux a été effectué suivant le mode opératoire utilisé au Laboratoire pour les isollements.

La suspension mère est amenée par dilutions successives à une concentration telle que les colonies sur les boîtes de PÉTRI soient suffisamment espacées, ceci afin d'éviter la cause d'erreur suivante. Lorsque les

(1) Déplacement signalé en 1931 par Ph. LASSEUR, J.-G. MARCHAL et A. DUPAIX.

colonies bactériennes sont trop proches l'une de l'autre, on assiste à une diminution considérable du nombre des plis chez le type Rb de *B. aurantiacus tingitanus*. Il devient, même au microscope, difficile de déterminer si une colonie, dans ces conditions est lisse ou plissée.

Les boîtes de PÉTRI de fabrication courante présentent de telles irrégularités que l'épaisseur de la couche de gelée nutritive varie d'un point de la boîte à l'autre. Aussi dans ces essais, n'ai-je utilisé que des boîtes à fond rigoureusement plat, et très bien calibrées, de telle sorte que l'épaisseur de la couche de gelée est encore sensiblement la même d'une boîte à l'autre, puisque le volume de milieu nutritif distribué dans chaque boîte est mesuré.

En 1936, Ph. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR font observer que lorsqu'on coule de la gélose fondue dans une boîte de PÉTRI il se forme par refroidissement des gouttelettes d'eau sur le couvercle de la boîte. « *L'importance de ce phénomène varie avec la nature de la gelée nutritive, avec la température de la gélose liquéfiée, la température de la boîte, la température de l'enceinte où est placée la boîte renfermant la gelée ensemencée. Ce qui est beaucoup moins visible et ne s'observe qu'à la loupe ou au microscope, c'est la présence de très fines gouttelettes à la surface de la gélose. Ces gouttelettes n'ont évidemment qu'une durée éphémère. Leur contour est arrondi ou lobé et dans ce dernier cas, on trouve toujours une fine particule à l'origine de l'échancrure* ».

Si on est conduit à effectuer la culture à l'étuve à 37° C., il est nécessaire de munir le couvercle de la boîte de PÉTRI d'un disque de papier filtre qui absorbe l'eau de condensation. Lorsque les cultures effectuées à température ordinaire, comme c'est le cas pour *B. aurantiacus tingitanus*, sont faites dans des boîtes munies de disques de papier, il est aisé de comprendre que ce dispositif diminue l'importance du film d'eau à la surface de la gelée. Pour ces raisons, les expériences ont été faites en double exemplaire :

- 1° En boîtes munies de disques de papier ;
- 2° En boîtes non munies de ce dispositif.

2° Culture en milieu liquide.

On distribue 7 cm³ exactement mesurés de milieu nutritif dans une série de tubes A, B, C, D... Après refroidissement on ajoute 0,1 cm³ de suspension bactérienne homogène à 4 milliards de germes au cm³, concentration telle que son apport ne détermine aucun trouble sensible du milieu

nutritif. Ces cultures sont abandonnées à la température ordinaire du Laboratoire.

Résultats expérimentaux

I. — Culture de *B. aurantiacus tingitanus* en milieu solide.

L'addition de 0,25 gr. de taurocholate de soude à 100 cm³ de gelée nutritive ne détermine pas de modifications perceptibles de la forme des colonies. Mais, quand le milieu nutritif renferme 0,50 gr. ou 1 gr. % de sel biliaire, on assiste à des variations sensibles de l'aspect des colonies.

J'examinerai les résultats obtenus avec chacun des trois types dissocies de *B. aurantiacus tingitanus*.

A) Type S.

Sur gélose peptonée non additionnée de substance tensio-active, les colonies de *B. aurantiacus tingitanus* type S sont rondes, à bords unis, lisses, fluorescentes vertes, tandis que sur gélose renfermant 0,50 gr. à 1 gr. % de taurochlorate de soude, on assiste à un essaimage de petites colonies autour des colonies mères plus grosses (fig. 1, Pl. IV). Ces colonies, fluorescentes vertes, présentent d'ailleurs des débuts de vallonements.

Les colonies obtenues sur boîtes de PETRI munies d'un disque de papier, n'ont subi aucune modification.

B) Type Ra:

Les colonies de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, typiques, offrent l'aspect dit en montagne de glace, et sont de dimensions assez grandes, tandis que sur gelée additionnée de taurocholate de soude (fig. 5, Pl. IV) l'image est toute différente; quelques colonies ont encore sensiblement la taille normale, mais émettent de nombreux prolongements, donnant des colonies secondaires petites. La plupart des colonies présentent l'aspect Ra, certaines cependant, sont presque lisses.

Dans ce cas également le disque de papier filtre placé dans les cou-

vercles des boîtes de PETRI semble anihiler l'action du taurocholate de soude.

C) *Type Rb*:

L'action du taurocholate de soude sur ce type bactérien est beaucoup moins nette; on observe peu de colonies essaimantes. L'intensité du plissement subit seulement une diminution légère.

Dans les boîtes de PETRI, munies d'un disque de papier filtre, le taurocholate de soude, (du moins dans les limites de l'expérimentation) ne semble pas, ainsi que le montre le tableau suivant, avoir d'action sur l'aspect des colonies *S*, *Ra* et *Rb* de *B. aurantiacus tingitanus*.

TABLEAU.

TABLEAU III

ASPECT DES COLONIES DES TROIS TYPES DE *B. aurantiacus tingitanus*, REMLINGER et BAILLY, 1935
EN FONCTION DE LA COMPOSITION DE LA GÉLOSE.

Aspect des Colonies sur —	Type S —	Type Ra —	Type Rb —
gélose ordinaire.	Colonies rondes à bord entier ; lisses ; vertes fluorescentes.	Colonies arrondies, à bord lobé, ayant l'aspect « en montagne de glace », colo- ration jaune orangé.	Colonies très plissées, à bord découpé ; coloration orangé.
gélose additionnée de taurocho- late de soude (0,5 %). Boîte non munie d'un disque de pa- pier filtre.	Colonies rondes à bord en- tier, montrant un début de vaillonnement. Ces colonies sont entourées d'une multi- tude de colonies secondai- res ; coloration verte fluo- rescente.	Colonies essaimantes, plus pe- tites que dans le système té- moin, ayant plus ou moins bien conservé l'aspect typi- que Ra ; coloration jaune orangé.	Colonies essaimantes, plus ar- rondies que dans le système témoin, un peu moins plis- sées ; coloration orangé.
gélose additionnée de taurocho- late de soude (0,5 %). Boîte munie d'un disque de papier filtre.	Colonies rondes à bord en- tier ; lisses, vertes fluores- centes.	Colonies arrondies, à bord lobé, ayant l'aspect « en montagne de glace » ; colo- ration jaune orangé.	Colonies très plissées, à bord découpé ; coloration orangé.

En résumé l'action du taurocholate de soude sur l'aspect des colonies sur gélose de *B. aurantiacus tingitanus* se traduit surtout par une déformation du bord entier des colonies en bord lobé, avec essaimage de petites colonies secondaires.

On pourrait dire que le taurocholate de soude, substance tensio-active, agit en modifiant la structure du gel nutritif. Le papier filtre diminue l'importance de la condensation, de ce fait, modifie les retraits de la gelée et par suite la quantité d'eau libérée par synérèse.

II.) Culture de *B. aurantiacus tingitanus* en milieu liquide.

L'action des deux sels biliaires, ayant été expérimentée, je vais d'abord envisager l'action du taurocholate de soude, puis celle du glycocholate de soude sur chacun des trois types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY.

1° Taurocholate de soude.

A) Type S:

Le fait, le plus saillant (et le moins prévisible) à noter, est le plissement des voiles des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* S en solution peptonée additionnée de taurocholate de soude, l'intensité du plissement augmentant avec la concentration en substance tensio-active.

La production de pigment vert fluorescent ne semble pas modifiée, tandis que la quantité de pigment orangé formé est augmentée ainsi que le montre l'examen du tableau ci-dessous.

TABLEAU.

TABLEAU IV

ACTION DU TAUROCHOLATE SUR L'ASPECT DES CULTURES EN EAU PEPTONÉE DE *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER ET BAILLY, 1935, TYPE S.

Désignation des systèmes	Quantité de taurocholate de soude en gr. %	pH	Aspect des cultures âgées de 8 jours	pH des cultures âgées de 8 jours
A	0	6,88	Pellicule; liquide trouble; fluorescence verte.	7,94
B	0,25	6,87	Voile légèrement plissé; liq. moins trouble que A; fluo- rescence verte.	7,68
C	0,50	6,66	Voile en draperies; liquide trouble; fluorescence verte.	7,71
D	1,00	6,54	Voile plissé; liquide trouble; fluorescence verte et colora- tion orangé.	7,83

B) *Type Ra*:

Les résultats observés avec ce type bactérien sont schématisés dans le tableau suivant.

TABLEAU V

ACTION DU TAUROCHOLATE DE SOUDE SUR L'ASPECT DES CULTURES EN EAU PEPTONÉE DE *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER ET BAILLY, 1935, TYPE *Ra*

Désignation des systèmes	Quantité de taurocholate de soude en gr. %	pH	Aspect des cultures âgées de 8 jours.	pH des cultures âgées de 8 jours
A	0	6,88	pellicule; liquide très trouble; sensiblement incolore.	7,77
B	0,25	6,87	pellicule, liquide très trouble; fluorescence verte.	7,68
C	0,50	6,66	pellicule; liquide très trouble; fluorescence verte plus in- tense qu'en B.	7,72
D	1,00	6,54	pellicule; liquide très trouble; coloration jaune et fluores- cence verte.	7,64

Les cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Ra montrent une pellicule et un liquide trouble, aussi bien en solution peptonée à 2 % qu'en solution peptonée additionnée de taurocholate de soude aux concentrations utilisées.

Par contre, la fonction chromogène de *B. aurantiacus tingitanus* Ra est exaltée. L'accumulation de pigment jaune et de pigment fluorescent vert est favorisée par la présence de ce sel biliaire.

L'augmentation de la fluorescence n'est pas due à un accroissement de la concentration en ions OH^- , mais à une plus grande production de substance fluorescente verte, ainsi que l'on peut s'en rendre compte en examinant la valeur du pH des milieux non ensemencés et celui des cultures, 8 jours après l'ensemencement.

C) Type Rb:

Le taurocholate de soude ne détermine aucune modification sensible de l'aspect et de la coloration des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Rb.

En résumé les trois types bactériens dissociés de B. aurantiacus tingitanus réagissent de façons différentes à l'influence du taurocholate de soude; la croissance du type S est modifiée, la fonction chromogène du type Ra est augmentée, par contre la fonction chromogène et la croissance du type Rb sont insensibles à l'action du taurocholate de soude.

2°) Glycocholate de soude.

B. aurantiacus tingitanus S subit sous l'action du glycocholate des modifications analogues à celles provoquées par le taurocholate de soude, c'est à dire que l'on observe des voiles plissés et une production plus importante du pigment orangé. Avec le type Ra, on observe des faits analogues. Comme le taurocholate, le glycocholate de soude est sans effet sur la végétation, mais exalte la production de pigment orangé et de pigment fluorescent vert.

Enfin, le type Rb, non influencé par le taurocholate de soude, montre des cultures à voile de plus en plus plissé à mesure que croît la concentration en glycocholate, ainsi qu'il ressort de l'examen du tableau ci-dessous.

TABLEAU VI

ACTION DU GLYCOCHOLATE DE SOUDE SUR L'ASPECT DES CULTURES
EN EAU PEPTONÉE DE *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER ET BAILLY,
1935, TYPE *Rb*.

Désignation des systèmes —	Quantité de glycocholate de soude en gr. % —	pH —	Aspect des cultures âgées de 8 jours —	pH des cultures âgées de 8 jours —
A	0	6,88	voile lisse; liquide très trouble; fluorescence verte à l'œil nu et aux U. V.	7,62
B	0,25	6,88	voile plissé; liquide trouble; coloration orangé; fluorescence verte aux U. V.	7,57
C	0,50	6,85	voile plissé; liquide moins trouble; coloration orangé; fluorescence verte aux U.V.	7,58
D	1,00	6,76	voile plus plissé (maximum de plissements); liquide trouble orangé; fluorescence aux U. V.	7,55

En résumé, les substances tensio-actives utilisées au cours de ces expériences ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des 3 types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus*. Mais ces résultats sont en harmonie avec ceux obtenus en 1932 par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES.

CHAPITRE IV.

Action de l'acide phénique sur les types *Ra*, *Rb* et *S* de *B. aurantiacus tngitanus* Remlinger et Bailly 1935

Généralités

Déjà E. DUCLAUX (1898) insiste longuement sur la difficulté qu'il y a à établir une différenciation nette entre l'antiseptique et l'aliment. Et aujourd'hui tout le monde sait qu'une même substance *S* peut (suivant la concentration dans le milieu nutritif) stimuler la croissance des Bactéries, ou diminuer légèrement la vitesse de croissance, ou l'amener à une valeur telle qu'elle paraît nulle ou enfin déterminer la mort de la plastide.

Lorsque la vitesse de croissance est assez ralentie pour que le milieu ensemencé reste limpide pendant des jours, des semaines on expérimente dans la zone des concentrations infertilisantes (1). La concentration mortelle sera celle qui non seulement se sera opposée à la multiplication des plastides dans le milieu additionné de substance *S*, mais qui très certainement d'ailleurs aura déterminé la mort des Bactéries, ce dont on s'assure en transportant les germes dans un milieu dépourvu de substance *S*.

L'action d'une substance sur le tableau de la vie d'une Bactérie peut donc être envisagée à des points de vue différents.

Dans cet article, je ne veux pas faire une étude systématique du pou-

(1) Il est évident que suivant la température de culture, la composition du milieu, la concentration infertilisante de la substance *S* variera pour un même microbe.

voir antiseptique de l'acide phénique (1) mais étudier si ce phénol permet de différencier les types *Ra*, *Rb*, *S* de *B. aurantiacus tingitanus* ainsi que l'on peut le voir dans les lignes suivantes.

Pour la partie théorique de cette question je renvoie le Lecteur aux travaux de A. DUPAIX (1933), J. FABICKI (1923), BIDZINSKI (1926), J. SERRA (1932).

Recherches personnelles

TECHNIQUE

Dans ces expériences, à l'aide d'une solution à 5 pour cent d'acide phénique, j'ai réalisé des milieux de concentration croissante en acide phénique. A cet effet, des tubes A, B, C,, reçoivent 20 cm³ de solution de peptone à 2 pour 100; après stérilisation on ajoute aseptiquement des doses croissantes de solution d'acide phénique (2), puis onensemence dans chaque tube 0 cm³ 2 de suspension homogène de corps bactériens des types *Ra*, *Rb*, *S* de *B. aurantiacus tingitanus*. Après ensemencement les tubes sont abandonnés à la température du laboratoire; les systèmes ainsi réalisés sont examinés méthodiquement au bout de 2 jours, 4 jours, 7 jours de culture.

Résultats expérimentaux

J'envisagerai successivement l'action de l'acide phénique sur les trois types de *B. aurantiacus tingitanus*. Le tableau VII résume l'action de l'acide phénique sur *B. aurantiacus* type *Ra*.

(1) Fait bien connu depuis longtemps.

(2) Je reconnais que ce mode opératoire a le défaut de faire varier le volume du liquide puisqu'à un volume constant de solution de peptone on ajoute des doses croissantes de solution d'acide phénique. Cependant la cause d'erreur n'est pas très grande puisqu'elle n'a varié que dans le rapport de 1 à 1,05.

TABLEAU.

TABLEAU

INFLUENCE DE L'ACIDE PHÉNIQUE SUR LE TABLEAU DE LA VIE

Désignation des systèmes	Concentration du milieu en acide phénique	Aspect des cultures âgées de 48 h.	
		Végétation	Coloration
A	0	Voile lisse; Trouble léger;	Voile blanc; Liq. jaune;
B	0 gr. 025	Liq. très légèrement trouble;	Liq. incolore;
C	0 gr. 050	Pas de développement apparent	
D	0 gr. 100	»	»
E	0 gr. 150	»	»
F	0 gr. 200	»	»
G	0 gr. 250	»	»
H	0 gr. 275	»	»

Dans le système *B* (0 gr. 025) l'acide phénique ne modifie pas sensiblement la végétation du type *Ra* de *B. aurantiacus tingitanus*. Par contre, le développement est nettement entravé à la concentration *C* (0 gr. 050) et c'est ainsi que dans les milieux *D* (0 gr. 100) on n'observe plus aucun développement bactérien.

VII

B. aurantiacus tingitanus REMLINGER ET BAILLY TYPE *Ra*.

Aspect des cultures âgées de 4 jours		Aspect des cultures âgées de 7 jours	
Végétation	Coloration	Végétation	Coloration
Voile lisse; Trouble de toute la colonne de liquide;	Voile blanc; Liq. jaune;	Voile lisse; Trouble de toute la colonne de Liq.;	Voile blanc; Liq. jaune vert; Fluorescence verte aux U. V.
Pellicule; Liquide très légèrement trouble;	Pellicule incolore; Liq incolore;	Voile lisse; Trouble de toute la colonne de Liq.;	Voile blanc; Liq fluorescent vert
Mince pellicule; Liq. très légèrement trouble;	Pellicule incolore; Liq incolore;	Pellicule; Léger trouble de toute la colonne de liq.	Liq. incolore;
Pas de développement apparent;	Liq. incolore;	Pas de développement apparent;	»
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	»	»

La fonction chromogène est même plus influencée que la végétation puisque dans le tube *B* on ne note plus qu'une fluorescence verte. Tel est du moins ce que l'on observe avec *B. aurantiacus tingitanus Ra*. Voyons maintenant comment va réagir le type *Rb* de *B. aurantiacus tingitanus*. Les résultats observés avec ce type bactérien sont schématisés dans le tableau VIII.

TABLEAU

INFLUENCE DE L'ACIDE PHÉNIQUE SUR LE TABLEAU DE LA VIE DE

Désignation des systèmes	Concentration (1) du milieu en acide phénique	Aspect des cultures âgées de 48 h.	
		Végétation	Coloration
A	0	Voile légèrement plissé Liq. très légèrement trouble;	Voile orangé; Liq. orangé sur une hauteur de 8 à 10 mm.;
B	0 gr. 025	Voile lisse; Trouble de toute la co- lonne de liq.;	Voile blanc; Liq. jaune orangé sur une zone de 10 mm.;
C	0 gr. 050	Pas de développement apparent;	Liq. incolore;
D	0 gr. 100	»	»
E	0 gr. 150	»	»
F	0 gr. 200	»	»
G	0 gr. 250	»	»
H	0 gr. 275	»	»

B. aurantiacus tingitanus type *Rb* se montre un peu plus résistant à l'action toxique de l'acide phénique que *B. aurantiacus tingitanus* type *Ra*. En effet, les Bactéries de type *Rb* se développent encore très largement dans le système *D*. Il y a plus, pour les tubes *C* (0 gr. 050) le voile devient lisse il est vrai, mais le liquide au lieu de rester limpide (comme

Remarques

(1) La concentration indiquée est en grammes pour 100.

(2) Une partie des plastides est déjà précipitée.

II

aurantiacus tingitanus REMLINGER ET BAILLY TYPE *Rb*.

Aspect des cultures âgées de 4 jours		Aspect des cultures âgées de 7 jours	
Végétation	Coloration	Végétation	Coloration
Voile légèrement plissé Liq. clair (2);	Voile orangé; Liq. orangé sur une zone de 15 mm.	Voile plissé; Liq. clair;	Voile orangé; Liq. orangé sur la moitié de la hau- teur du tube.
Voile lisse; trouble de toute la co- lonne de liq.	Voile blanc; Liq. jaune orangé sur une zone de 15 mm.	Voile plissé; Liq. légèrement trouble	Voile blanc; Liq. jaune orangé; coloration moins intense que celle du témoin;
très léger trouble;	Liq incolore;	Légère pellicule; Trouble faible;	Pellicule incolore; Liq. incolore;
as de développement apparent;	»	Léger trouble;	Liq. incolore;
»	»	Pas de développe- apparent;	»
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	»	»

dans le témoin) se trouble de façon intense; il semble donc que la modification d'aspect de la culture du milieu *B* tient plus à une différence dans l'aérobiose des germes qu'à la quantité de corps microbiens formés.

En présence d'acide phénique le type *Rb* de *B. aurantiacus tingitanus* est encore capable de produire son pigment à la concentration de 0 gr. 025 pour 100.

L'examen du tableau IX montre les résultats obtenus avec *B. aurantiacus tingitanus S*.

TABLEAU

INFLUENCE DE L'ACIDE PHÉNIQUE SUR LE TABLEAU DE LA VIE DE

Désignation des systèmes	Concentration du milieu en acide phénique	Aspect des cultures âgées de 48 h.	
		Végétation	Coloration
A	0	Voile lisse; Trouble de toute la colonne de liq.;	Voile blanc; Liq. incolore;
B	0 gr. 025	Pellicule; Léger trouble de toute la colonne de liq.	Pellicule blanche; Liq. incolore;
C	0 gr. 050	Pas de développement apparent;	Liq. incolore;
D	0 gr. 100	»	»
E	0 gr. 150	»	»
F	0 gr. 200	»	»
G	0 gr. 250	»	»
H	0 gr. 275	»	»

B. aurantiacus type *S* paraît se comporter de la même façon que le type *Ra* quand à la végétation, mais en ce qui concerne le pouvoir chromogène une complication apparaît. En effet, dans les conditions normales de culture, c'est à dire dans les milieux non additionnés d'antiseptique, le classement des trois types *Ra*, *Rb*, *S*, d'après leur pouvoir chromogène est quelque peu arbitraire. La coloration orangée des cultures de type *Rb* tient elle à une accumulation plus grande du pigment jaune citron qui s'observe dans les cultures de type *Ra* ou bien les pigments orangé et jaune citron sont-ils vraiment des pigments différents ? C'est ce qui reste à démontrer.

X

aurantiacus tingitanus REMLINGER ET BAILLY TYPE S.

Aspect des cultures âgées de 4 jours		Aspect des cultures âgées de 7 jours	
Végétation	Coloration	Végétation	Coloration
Voile lisse; Trouble de toute la colonne de liq.;	Voile blanc; Liq. incolore;	Voile lisse; Trouble de toute la colonne de liq.;	Voile blanc; Liq. fluorescent vert;
Pellicule; Trouble de toute la colonne de liq.;	Pellicule blanche; Liq. incolore;	Voile lisse; Trouble moins intense de toute la colonne de liq.;	Voile blanc; Liq. fluorescent vert;
Léger trouble;	Liq. incolore;	Pellicule; Trouble de toute la colonne de liq.;	Liq. incolore;
Pas de développement apparent;	»	Pas de développement apparent;	»
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	»	»

Sous ces réserves remarquons que dans ces conditions de culture *B. aurantiacus* type *Rb* donne un pigment orangé, que le type *Ra* fabrique un pigment jaune et une fluorescence verte, que le type *S* ne produit plus que le pigment fluorescent.

Ainsi envisagés, les trois germes ne présentent pas de différences sensibles dans leur résistance à l'acide phénique, puisque dans le système *B* (0 gr. 025) on retrouve encore le pigment caractéristique du type et qu'à la concentration *C* (0 gr. 050) aucune des cultures des types *Ra*, *Rb*, *S*, n'est colorée.

TABLEAU

ACTION DE L'ACIDE PHÉNIQUE SUR LES CULTURES D

Désignation des systèmes	Concentration du milieu en acide phénique	Aspect des cultures de « type Ra »	
		Végétation	Coloration
B	0 gr. 025	Diminution faible de la vitesse de croissance sensible surtout dans les premiers jours;	Action faible sur la fonction chromogène.
C	0 gr. 050	Diminution forte de la vitesse de croissance sensible surtout dans les premiers jours;	Culture non colorée
D	0 gr. 100	Arrêt de la végétation;	»
E	0 gr. 150	»	»

S'il est possible de suivre, avec plus ou moins de difficultés, les variations de toute une série de caractères d'une espèce bactérienne, il est un caractère fondamental de tout être vivant, qu'il est facile de mettre en évidence: l'arrêt de la multiplication, ce qui est réalisé dans les milieux renfermant la substance *S* aux concentrations infertilisantes.

Dans nos conditions d'expériences la dose infertilisante correspond aux systèmes *F* (0 gr. 200) pour le type *Rb*, *E* (0 gr. 150) pour les types *Ra* et *S*.

On conçoit l'existence de concentrations plus faibles que *E* et *F* qui permettraient le développement des germes dans certains tubes, d'autres restant stériles, cela en vertu du fait bien connu que toutes les plastides d'une même population bactérienne ne sont pas également résistantes aux effets toxiques.

Sous ces réserves reconnaissons que la dose infertilisante est la même pour les types *Ra* et *S* (0 gr. 150), le type *Rb* étant plus résistant (0 gr. 200).

On vient d'assister aux modifications du tableau de vie des Bactéries lorsque le milieu renfermait des quantités convenables d'acide phénique.

X

B. aurantiacus tingitanus REMLINGER ET BAILLY, TYPES *Ra*, *Rb*, *S*.

Aspect des cultures de « type Rb »		Aspect des cultures de « type S »	
Végétation	Coloration	Végétation	Coloration
Diminution très faible de la vitesse de croissance sensible surtout dans les premiers jours;	Action faible sur la fonction chromogène;	Diminution faible de la vitesse de croissance sensible surtout dans les premiers jours;	Production normale de pigment;
Diminution faible de la vitesse de croissance;	Culture non colorée;	Diminution forte de la vitesse de croissance sensible surtout dans les premiers jours;	Culture non colorée
Diminution forte de la vitesse de croissance;	»	Arrêt de la végétation;	»
Arrêt de la végétation;	»	»	»

On peut se demander si le séjour dans des milieux contenant 0 gr. 150 et 0 gr. 200 ne détermine pas de modifications profondes et transmissibles du type.

Si l'on s'en tient à l'aspect des cultures on constate que les plastides provenant de ces milieux donnent des cultures présentant les attributs spécifiques.

En réensemencant on obtenait toujours les caractères suivants: *B. aurantiacus* type *Rb*: Voile plissé orangé, liquide clair; *B. aurantiacus* type *Ra*: Voile lisse, coloration jaune, fluorescence verte; *B. aurantiacus* type *S*: Voile lisse, liquide trouble, fluorescence verte.

Il ne faudrait pas déduire de ces expériences que toutes les plastides qui se sont développées dans les milieux dépourvus d'acide phénique possèdent toutes le même caractère; il est très vraisemblable qu'un certain nombre a éprouvé de profondes variations, mais le plus grand nombre des germes de la population a conservé les attributs qui caractérisent l'espèce. Lorsque l'on s'adresse aux plastides qui ont séjourné dans les milieux *G* on retrouve les différences de résistance individuelle à l'antiseptique. C'est ce qui ressort de l'examen du tableau XI.

TABEA

RÉENSEMENCEMENT DES SYSTÈMES PHÉNIQUES *D*, *E*, *F*

Désignation des systèmes	Concentration du milieu en acide phénique	Aspect des cultures de « type Ra »	
		Végétation	Coloration
D	0 gr. 100	Voile lisse; Trouble dans toute la colonne de liquide;	Voile blanc; Liq. jaune vert; Fluorescence verte aux U. V.
E	0 gr. 150	»	»
F	0 gr. 200	Voile lisse; Trouble dans toute la colonne de liquide;	Voile blanc; Liq. jaune vert; Fluorescence verte aux U. V.
G	0 gr. 250	Végétation normale dans un tube sur 3;	Liq. incolore;
H	0 gr. 275	Pas de développement apparent;	»

Le séjour dans les milieux de concentration 0 gr. 275 % tue les Bactéries de type *Ra*, *Rb*, *S*, après 7 jours de contact.

C'est là une première approximation puisque toutes les plastides ne sont pas également résistantes aux antiseptiques, aussi chaque système comportait-il deux témoins.

Les résistances individuelles m'ont obligée à multiplier à chaque expérience non seulement le nombre des tubes de chaque concentration mais aussi à répéter avec des souches différentes d'un même type les essais sur la toxicité de l'acide phénique à l'égard des trois types *Ra*, *Rb*, *S* de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY.

Ainsi j'ai dû opérer sur des centaines de tubes et de ballons et de ce fait je ne crois pas qu'on puisse me reprocher des généralisations trop hâtives.

Je viens d'étudier le pouvoir de l'acide phénique sur *B. aurantiacus tingitanus*, en fonction d'un facteur: la concentration en acide phénique.

I

, H, DÉPOURVUS DE VÉGÉTATION APPARENTE

Aspect des cultures de « type S »		Aspect des cultures de « type Rb »	
Végétation	Coloration	Végétation	Coloration
Voile lisse, trouble dans toute la colonne de liquide;	Voile blanc; Liq. fluorescent vert;	Voile plissé; Liq. clair;	Voile orangé; Liq. orangé;
»	»	»	»
»	»	»	»
»	»	Léger trouble;	Liq. incolore;
Pas de développement apparent;	Liq. incolore;	Pas de développement apparent;	Liq. incolore;

disons maintenant quelques mots d'un autre facteur: l'âge du germe mis en expérience. L'acide phénique diminue surtout la vitesse de multiplication chez les jeunes cultures. Dans les cultures âgées de 7 jours le ralentissement est moins sensible.

En résumé, l'acide phénique influence moins la vitesse de croissance de B. aurantiacus de type Rb que celle des types Ra et S.

En ce qui concerne le pouvoir chromogène, c'est le type Ra qui est le plus sensible à l'action de l'acide phénique.

CHAPITRE V

Influence de la concentration en ions H^+ sur l'aspect des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Remlinger et Bailly 1935

Généralités

Depuis plusieurs années déjà (1930, 1931, 1932, 1934, 1935), Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs étudient l'influence de la concentration en ions H^+ , sur le tableau de la vie des Bactéries chromogènes.

Dans ce chapitre, je vais résumer quelques observations faites sur *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935.

Recherches personnelles

Les trois types dissociés, *Ra*, *Rb* et *S* sont cultivés :

1° en solution peptonée à 2 % ;

2° en milieux synthétiques, I et II de LASSEUR, milieux dont la composition est indiquée plus loin.

I) CULTURES EN EAU PEPTONÉE.

TECHNIQUE

Dans ces essais j'ai utilisé une solution peptonée à 2%, additionnée de doses croissantes de solution normale de soude.

Les mesures de pH sont effectuées par la méthode électrométrique (électrode rotative de LECOMTE DU NOUY et potentiomètre de TINSLEY). Toute la verrerie est en verre résistant (PYREX ou SIBOR).

J'envisagerai les modifications de l'aspect des cultures (voile, trouble, coloration) et les variations de pH de ces cultures après 2, 3, 4, 5 et 6 jours, et cela dans les différents essais qui ont été réalisés.

Résultats expérimentaux.

Première série d'essais

Je rappellerai d'abord les caractères de culture de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb, type Ra et type S en eau peptonée de pH = 7-7,2 milieu souvent utilisé pour la culture des Bactéries et qui est favorable à la végétation de *B. aurantiacus tingitanus*. Ces caractères ont été notés et décrits par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. BABOU en 1935 (1).

Chacun des trois types dissociés présente un aspect caractéristique bien différent, « avec le type S, les cultures âgées de 3 jours offrent un voile lisse, jaune orangé, la zone liquide sous-jacente est colorée en jaune sur une hauteur de 5 à 6 mm. Le germe se répartit dans toute la masse liquide qu'il trouble uniformément. Les cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Ra sont plus fortement colorées que celles du type S et leur teinte varie du jaune orangé au jaune brun. Le voile paraît lisse. Le trouble du liquide est moins intense qu'avec *B. aurantiacus tingitanus* type S. L'aspect des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb est très différent de celui des deux autres types. Le voile orangé est très plissé. La végétation paraît limitée à la zone superficielle car le liquide paraît complètement limpide. Cependant le pigment ne reste pas localisé dans la région superficielle, il diffuse dans une zone sous-jacente d'environ 5 à 8 millimètres ».

J'ai résumé ces caractères dans le tableau XII.

TABLEAU XII

CULTURE DE *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935
en eau peptonée à 2 % de pH = 7-7,2.

Type bactérien envisagé	Aspect des cultures	Coloration des cultures
Type Rb	Voile plissé; Liquide limpide;	Voile orangé; Liquide orangé;
Type Ra	Voile lisse; Liquide trouble;	Voile jaune orangé à jaune brun;
Type S	Voile lisse; Liquide plus trouble que pour le type Ra;	Liquide jaune brun; Voile jaune orangé; Liquide jaune;

(1) Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et G. BABOU. Observations sur *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY, 1935 (1^{er} mémoire), Fasc. VIII, Trav. Lab. Microb., 1935, pp. 46-47.

Les caractères de ces trois types étant établis, voyons quelles modifications vont subir les cultures lorsque le pH des milieux nutritifs varie de $\text{pH}_i = 5,83$ à $\text{pH}_i = 9,04$ (1).

J'ai noté dans les tableaux qui vont suivre les caractères les plus saillants des cultures, c'est-à-dire : l'aspect du voile, la production de corps coloré, orangé ou fluorescent, et le trouble de la colonne de liquide nutritif.

1° ESSAI EFFECTUÉ SUR *B. aurantiacus tingitanus* TYPE *Rb*.

Dans les milieux *A* de $\text{pH}_i = 5,83$, le voile est épais, plissé, orangé. Tandis que dans les milieux *D* de $\text{pH}_i = 9,04$, le voile est mince, lisse jaunâtre ; à mesure que le voile s'amincit (aux pH plus alcalins) le liquide (clair dans les milieux acides) devient de plus en plus trouble. Les plastides qui pour des pH de l'ordre de 6 sont localisées vers la surface du liquide, envahissent progressivement toute la colonne liquide, lorsque le pH passe de 6 à 8.

(1) Dans un but de simplification typographique, le pH initial des cultures est désigné par l'abréviation pH_i .

TABLEAU XIII

CULTURE DE *B. aurantiacus tingitanus* TYPE Rb
en solution peptonée de pH différents.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 4 jours	pH des cultures âgées de 4 jours
A	5,83	Voile plissé orangé; pigment orangé; liquide clair;	7,11
B	5,86	Voile plissé orangé; pigment orangé; liquide clair;	
C	5,95	Voile plissé orangé; pigment orangé; liquide clair;	7,15
D	6,20	Voile plissé jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	
E	6,38	Voile plissé jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	7,32
F	6,50	Voile moins plissé jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	
G	6,63	Voile très peu plissé; jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	7,42
H	6,91	Voile très peu plissé; jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	
I	7,21	Voile très peu plissé; jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide clair.	
J	7,33	Voile lisse jaune orangé; pigment jaune orangé; liquide louche.	7,75
K	7,51	Voile lisse jaune; pigment jaune; liquide louche.	
L	7,77	Voile lisse jaune; pigment jaune; liquide louche.	8,02
M	8,11	Voile lisse jaune; pigment jaune vert; liquide louche.	
N	8,68	Voile lisse jaune; pigment jaune vert; liquide trouble.	8,45
O	9,04	Voile lisse mince jaunâtre; fluorescence verte; trouble uniforme de toute la masse.	8,69

L'examen du tableau XIII montre que les milieux acides ($pH_1 = 5,83-6,91$) sont plus favorables à la production de corps coloré orangé que les milieux alcalins. Dans ces derniers ($pH_1 : 9,04$) les cultures présentent une fluorescence verte.

2° ESSAI EFFECTUÉ SUR *B. aurantiacus tingitanus* TYPE S.

Avec ce type bactérien les constatations sont un peu différentes de celles faites précédemment. Si le voile reste lisse du milieu A au milieu O,

on observe cependant un amincissement progressif de cette formation en même temps qu'une diminution du trouble de la colonne liquide.

Alors qu'à $\text{pH}_1 = 5,83$, la Bactérie secrète un corps coloré jaunâtre peu intense, à $\text{pH}_1 = 7,77$, on assiste à une modification de la coloration de la culture qui passe au jaune vert. A $\text{pH}_1 = 8$, le pigment orangé a disparu, on observe seulement une fluorescence verte. Lorsque le pH augmente encore, la fluorescence verte diminue, puis disparaît pour un pH_1 de l'ordre de 9,04.

Ces constatations sont résumées dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV
CULTURE DE *B. aurantiacus tingitanus* TYPE S
en solution peptonée de pH différents.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 4 jours	pH des cultures âgées de 4 jours
A	5,83	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,17
B	5,86	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,32
C	5,95	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,42
D	6,20	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre trouble uniforme intense.	7,49
E	6,38	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,63
F	6,50	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,73
G	6,63	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,81
H	6,91	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,85
I	7,21	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,92
J	7,33	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	7,95
K	7,51	Voile lisse blanc; coloration jaunâtre; trouble uniforme intense.	8,09
L	7,77	Voile lisse blanc; coloration jaune vert; trouble uniforme.	8,21
M	8,11	Voile lisse blanc; fluorescence verte; trouble uniforme.	8,40
N	8,63	Voile lisse blanc; coloration jaune-vert; trouble uniforme.	8,62
O	9,04	Voile lisse mince blanc; léger trouble.	8,64

3° ESSAI EFFECTUÉ SUR *B. aurantiacus tingitanus* type *Ra*.

Ce type bactérien, comme d'ailleurs *B. aurantiacus tingitanus* type *S*, ne montre jamais, en eau peptonée et quel que soit le pH (du moins dans les limites de l'expérimentation) un voile plissé, le voile reste mince, lisse et le liquide sous-jacent présente toujours un trouble d'intensité variable.

Les cultures offrent une coloration jaune orangé ($pH_1 = 5,83$ à $pH_1 = 6,50$) elles passent au jaune ($pH_1 = 6,63$ à $pH_1 = 7,51$) puis au jaune vert et montrent enfin une fluorescence verte, encore très perceptible quand le milieu de culture atteint $pH_1 = 9,04$. C'est cette dernière constatation qui différencie *B. aurantiacus tingitanus* type *S* de *B. aurantiacus tingitanus* type *Ra*, puisque ce dernier a une zone de fluorescence verte plus étendue.

Ces résultats sont consignés dans le tableau XV.

TABLEAU XV

CULTURE DE *B. aurantiacus tingitanus* TYPE *Ra*
en solution peptonée de pH différents.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 4 jours	pH des cultures âgées de 4 jours
A	5,83	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	7,27
B	5,86	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	
C	5,95	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	7,34
D	6,20	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	
E	6,38	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	7,48
F	6,50	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble et jaune orangé.	
G	6,63	Voile lisse mince; liquide uniformément trouble, trouble plus intense qu'en A. B. C. D. E. F.	7,61
H	6,91	Voile lisse mince; trouble uniforme, très intense; col. jaune.	
I	7,21	Voile lisse mince; trouble uniforme très intense; col. jaune.	
J	7,33	Voile lisse mince; trouble uniforme, très intense; col. jaune.	7,84
K	7,51	Voile lisse mince; trouble uniforme très intense; col. jaune.	
L	7,77	Voile lisse mince; trouble uniforme très intense; col. jaune-vert.	8,16
M	8,11	Voile lisse mince; trouble uniforme; fluorescence verte.	
N	8,68	Voile lisse mince; trouble uniforme; fluorescence verte.	8,58
O	9,04	Voile lisse mince; trouble plus léger; légère fluorescence verte.	8,64

Pour les trois types dissociés le pH a été déterminé (et cela sur un échantillon moyen), 4 jours après ensemencement des milieux de culture.

B. aurantiacus tingitanus, quel que soit le type envisagé, tend à alcaliniser les milieux cultureux quand le pH initial est inférieur à 8 et à l'acidifier quand le pH initial est supérieur à 8.

Déjà en 1923, SIERAKOWSKI avait fait des constatations analogues, mais en 1932, Ph. LASSEUR, R. FRIBOURG et M. GROJEAN montraient

que certains faits ne s'expliquaient pas par des variations de pH lorsque l'on déterminait ce dernier sur un échantillon moyen de la culture. Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont maintes fois attiré l'attention sur le fait que la diffusion ne suffit pas à assurer la répartition des « produits microbiens » dans toute la masse liquide au sens de E. DUCLAUX.

Deuxième série d'essais

C'est la raison pour laquelle, au cours d'une seconde série d'expériences, j'ai déterminé le pH de la couche supérieure de liquide et celui de la couche inférieure de la culture. En effet, il est logique de penser que la zone de grande multiplication est aussi la zone de transformation la plus intense, des constituants du milieu.

C'est ce qui résulte de l'examen du tableau XVI.

TABLEAU.

TABLEAU

B. aurantiacus tingitanus S. — ASPECT DES CULTURES EN

Désignation des milieux de culture (1)	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 48 h.	Aspect des cultures âgées de 3 jours	pH des cultures âgées de 3 jours (2)
—	—	—	—	—
A	5,96	Voile incolore, lisse; Liq. incolore; léger trouble uniforme.	Voile incolore lisse; Liq. incolore; Trouble uniforme.	7,20 (sup.) 6,92 (inf.) 7,76 (sup.)
C	7,03	Même aspect qu'en A. Voile incolore lisse;	Même aspect qu'en A.	7,43 (inf.) 8,19 (sup.)
E	8,09	Liq. fluorescent; Trouble uniforme. Voile incolore lisse mince;	Fluorescence dans tous les tubes.	8,10 (inf.) 8,47 (sup.)
G	8,61	Liq. incolore; Trouble uniforme.	Fluorescence faible dans tous les tu- bes.	8,37 (inf.)
H	8,81	Pellicule; Liq. incolore; Trouble uniforme.	Pellicule; Liq. incolore; Trouble uniforme.	8,52 (sup.) 8,47 (inf.)

L'aspect des cultures âgées de 2 jours, 3 jours, 4 jours et 5 jours est le même que celui de la première série d'essais.

Les mesures de pH ont été faites après 3, 4, 5 jours de culture; certains milieux aux pH trop voisins, donnant par là même des différences peu accusées ont été supprimés du tableau, afin d'en simplifier la composition typographique.

(1) Les différents milieux renferment des quantités croissantes de soude. Les résultats fournis par les milieux B, D, F, étant trop voisins de ceux fournis par les milieux ci-dessus, je me suis limitée aux plus intéressants.

(2) Deux ombres figurent dans les colonnes relatives au pH des cultures; l'un a trait au pH de la couche supérieure de la culture (sup.), l'autre au pH de la couche profonde (inf.).

XVI

AU PEPTONÉE ADDITIONNÉE DE DOSES CROISSANTES DE SOUDE.

Aspect des cultures âgées de 4 jours	pH des cultures âgées de 4 jours	Aspect des cultures âgées de 5 jours	pH des cultures âgées de 5 jours
Voile blanc lisse;	7,66 (sup.)	Voile blanc lisse;	7,65 (sup.)
Liq. incolore;	7,01 (inf.)	Trouble uniforme;	7,08 (inf.)
Trouble uniforme.	8,23 (sup.)	Liq. incolore.	7,82 (sup.)
Même aspect qu'en A.	7,49 (inf.)	Voile blanc lisse;	7,42 (inf.)
Voile blanc lisse;	8,20 (sup.)	Liq. incolore;	8,20 (sup.)
Belle fluorescence verte	8,18 (inf.)	Trouble uniforme.	8,04 (inf.)
Trouble uniforme.	8,47 (sup.)	Voile blanc lisse;	8,35 (sup.)
Même aspect qu'en G.	8,49 (inf.)	Belle fluorescence verte;	8,32 (inf.)
Pellicule blanche;	8,56 (sup.)	Trouble uniforme.	8,40 (sup.)
Liq. incolore;	8,54 (inf.)	Même aspect qu'en G.	8,32 (inf.)
Trouble uniforme.		Pellicule blanche;	8,40 (sup.)
		Liq. incolore;	8,32 (inf.)
		Trouble uniforme.	

Quand le pH initial varie entre 5,96 et 8, le pH de la zone supérieure diffère nettement de celui de la zone inférieure; l'importance du voile dans les milieux A et C explique facilement ces variations du pH, puisque la zone supérieure est la zone de grand développement donc de fortes modifications.

Dans les milieux E, G, H on assiste, et à l'amincissement du voile, et à une diminution de la différence entre le pH de la zone supérieure et le pH de la zone inférieure. La végétation paraît décroître mais ce sont surtout les germes qui envahissent de plus en plus la masse liquide.

De même que dans la première expérience, *B. aurantiacus tingitanus* S alcalinise les milieux de pH₁ = 5,96, 7,03, il a peu d'action sur le pH

du milieu *E* ($\text{pH}_1 = 8,09$), il acidifie les milieux *G* et *H* ($\text{pH}_1 = 8,61$, $8,81$).

VARIATIONS DU pH DES CULTURES EN EAU PEPTONÉE

DE *B. aurantiacus tingitanus* TYPE *Rb*.

Voyons maintenant, comment, au cours de trois séries d'expériences varie le pH des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* type *Rb*, en fonction de différents facteurs.

Comme je l'ai noté dans la première série d'expériences, le voile, plissé à $\text{pH}_1 = 5,96$, est lisse à $\text{pH}_1 = 8,81$. Les mesures des pH des couches supérieures, à des âges différents et dans les différents systèmes conduisent aux conclusions suivantes qui découlent d'ailleurs de l'examen du tableau ci-dessous.

B. aurantiacus tingitanius type Rb. — CULTURES EN EAU PEPTONÉE ADDITIONNÉE DE DOSES CROISSANTES DE SOUDE

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Couche de liquide envisagée	pH des cultures âgées de				
			2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours
A	5,96	supérieure	7,85 (1)	8,04 (1)	7,49 (1) 7,42 (2)	7,51 (1)	7,49 (3)
		inférieure	6,62 (1)	7,46 (1)	7,23 (1) 6,84 (2)	7,25 (1)	7,23 (3) voile plissé
B	6,36	supérieure			7,68 (2)		7,87 (3)
		inférieure			6,98 (2)		7,58 (3)
C	7,03	supérieure	8,04 (1)		7,75 (1)	7,71 (1)	7,78 (3)
		inférieure	7,68 (1)	7,35 (1)	7,41 (1) 7,23 (2)	7,39 (1)	7,58 (3)
D	7,43	supérieure	7,66 (1)	7,61 (1)	7,80 (1)	7,85 (1)	7,85 (3)
		inférieure	7,72 (1)	7,49 (1)	7,66 (1) 7,58 (2)	7,68 (1)	7,65 (3)
E	8,09	supérieure			8,20 (2)		
		inférieure			8,14 (2)		
F	8,44	supérieure	8,18 (1)	8,01 (1)	8,18 (1)	8,04 (1)	8,18 (3)
		inférieure	8,09 (1)	8,04 (1)	8,38 (2) 8,59 (1)	8,08 (1)	8,08 (3)
G	8,61	supérieure			8,35 (2)		8,35 (3)
		inférieure			8,47 (2)		8,18 (3)
H	8,81	supérieure	8,30 (1)	8,28 (1)	8,45 (1)	8,39 (1)	8,35 (3)
		inférieure	8,26 (1)	8,35 (1)	8,52 (2) 8,47 (1)	8,29 (1)	8,26 (3) voile lisse.

Remarque. — Les nombres 1, 2, 3 (suivant les valeurs des pH), indiquent s'il s'agit de la première ou de la seconde ou de la troisième expérience.

Dans la zone des pH_1 acides, les cultures âgées de 48 heures montrent des différences considérables entre le pH de la couche supérieure (7,85) et celui de la couche inférieure (6,62). Après 8 jours de culture la différence est moins importante puisque l'on obtient 7,51 pour le pH de la couche supérieure, et 7,25 pour celui de la couche profonde. Dans le premier cas la différence est égale à 1,23, tandis qu'elle n'atteint plus que 0,26 dans le second.

Lorsque le pH est plus alcalin, les différences (1) que l'on observe sont peu importantes et souvent égales aux erreurs de mesure.

Dans l'étude précédente, la composition du milieu utilisé (solution peptonée 2 %) n'est pas chimiquement définie. Afin de vérifier les résultats obtenus, j'ai cultivé *B. aurantiacus tingitanus* sur les milieux synthétiques L_1 et L_2 de LASSEUR, dont la formule est indiquée ci-dessous.

Milieu synthétique I de LASSEUR

Asparagine.	0,900 gr.
Glycérine	2,500 gr.
Phosphate bipotassique.	0,250 gr.
Sulfate de magnésium.	0,500 gr.
Chlorure de calcium.	0,040 gr.
Sulfate ferreux	0,010 gr.
Soude N/10.	8 cm ³
Eau distillée ($K = 1 \times 10^{-8}$) Q. S. pour.....	100 cm ³

Milieu synthétique II de LASSEUR

Asparagine.	0,900 gr.
Succinate d'ammonium.	0,100 gr.
Glycérine.	2,000 gr.
Glucose.	1,000 gr.
Phosphate bipotassique.	0,250 gr.
Sulfate de magnésium.	0,500 gr.
Chlorure de calcium.	0,040 gr.
Sulfate ferreux.	0,010 gr.
Soude N/10.	8 cm ³
Eau distillée ($K = 1 \times 10^{-8}$) Q. S. pour.....	100 cm ³

(1) Comme je l'ai déjà noté pour les Bactéries de type S.

Voyons tout d'abord ce que donnent en milieux synthétique L_1 et L_2 normaux les types Rb, Ra et S de *B. aurantiacus tingitanus* (1).

TABLEAU XVIII

Désignation des milieux	Aspect des cultures âgées de 48 heures de différents types de <i>B. aurantiacus tingitanus</i>		
	Type S	Type Rb	Type Ra
L_1	Voile lisse, jaune; Fluorescence verte; Liquide trouble;	Voile plissé orangé; Liquide orangé; Légère fluorescence verte; Liquide clair;	Voile presque lisse orangé; Liquide orangé; Liquide clair;
L_2	Voile lisse jaune; Liquide jaune; Liquide trouble;	Voile plissé orangé; Liquide orangé; Liquide clair;	Voile presque lisse rouge orangé; Liquide orangé; Liquide clair;

Ainsi que le faisaient remarquer à ce moment Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY et F. FERRY, « le milieu L_1 favorise surtout la fluorescence et le milieu L_2 la production de pigment orangé » (2).

TECHNIQUE

1° Culture de *B. aurantiacus tingitanus* en milieu L_2 .

Les milieux de culture de pH variable sont obtenus par addition de quantités croissantes de solution normale de soude à un même volume de milieu synthétique préparé suivant la technique habituelle.

Le milieu dépourvu de soude a un pH égal à 5,13, le milieu le plus alcalin utilisé au cours de ces essais, a un pH égal à 6,08.

(1) Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY et F. FERRY. Observations sur la chromogénèse de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY, 1935. (2° Mémoire, Fasc. VIII, Trav. Lab., 1935, p. 55.)

(2) Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR, H. SIRGUEY, F. FERRY, Trav. Lab., Fasc. VIII, 1935, p. 55.

Résultats expérimentaux.

a) Type Rb.

Le tableau XIX résume les caractères de culture de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb.

TABLEAU XIX

B. aurantiacus tingitanus type Rb.

Culture sur milieu L₂ additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 5 jours
A	5,13	Voile plissé, orangé; liquide jaune vert; fluorescence verte; trouble uniforme.
B	5,36	Voile plissé jaune, îlots orangés; coloration verte; fluorescence verte; trouble uniforme.
C	5,53	Voile plissé jaune orangé; liquide jaune-vert; fluorescence verte; trouble uniforme.
D	5,70	Voile plissé jaune orangé; liquide jaune-vert; fluorescence verte; trouble uniforme.
E	5,78	Voile plissé jaune; liquide jaune-vert; fluorescence verte; trouble uniforme.
F	5,92	Voile plissé jaune; liquide jaune-vert; fluorescence verte; trouble uniforme.
G	6,08	Voile plissé jaune; liquide jaune-vert; fluorescence verte; trouble uniforme.

De l'examen de ce tableau, il apparaît que si le mode de plissement du voile n'est pas modifié, la coloration du voile diminue jusqu'à pH₁ = 5,79, devient jaune citron puis jaune vert dans la zone comprise entre pH₁ = 5,79 et pH₁ = 6,08.

b) Type Ra.

Le voile des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Ra est lisse quel que soit le pH auquel l'expérimentation a eu lieu. De même, qu'avec les cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Rb, la coloration orangée diminue au fur et à mesure que le pH croît. La fluorescence, que l'on note seulement de façon nette au système F, varie dans le même sens que le pH du milieu de culture.

Ces constatations sont schématisées dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU XX

B. aurantiacus tingitanus type Ra.

Culture sur milieu L₂ additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	pH des cultures âgées de 5 jours		Aspect des cultures âgées de 5 jours
		couche supérieure	couche inférieure	
A	5,13	6,02	5,61	Voile lisse, collerette orangée; liquide orangé; trouble uni- forme.
B	5,36	6,25	5,61	Voile lisse, collerette orangée; liquide orangé; trouble uni- forme.
C	5,53	5,93	5,71	Voile lisse, collerette jaune- orangé; liquide orangé; trouble uniforme.
D	5,70	5,74	5,81	Voile lisse, collerette jaune- orangé; liquide jaune oran- gé; trouble uniforme.
E	5,79	5,98	5,90	Voile lisse, collerette jaune; liquide jaune; trouble uni- forme.
F	5,92	6,21	6,00	Voile lisse, collerette jaune; liquide jaune-vert; trouble uniforme.
G	6,08	6,58	6,22	Voile lisse, collerette jaune; fluorescence verte; trouble uniforme.

c) Type S.

Un fait attire immédiatement l'attention: *B. aurantiacus tingitanus* Rb donne des voiles plissés, *B. aurantiacus tingitanus* Ra des voiles lisses. Les Bactéries de type S présentent au contraire au cours de ces expériences des voiles plissés, en milieu synthétique L₂ quel que soit le pH.

Il ne s'agit pas d'une contamination ni même d'une variation de culture puisque des isollements pratiqués sur gélose de pH_i = 7 en partant

des voiles de *B. aurantiacus tingitanus* S développés sur milieu synthétique L₂, n'ont jamais montré de colonies plissées.

La coloration du voile diminue à mesure que le pH croît; elle est orangé à pH₁ = 5,13, devient jaune (pH₁ = 5,36), puis jaune citron, jaunâtre, puis incolore (pH₁ = 6,08).

La fluorescence verte faible, mais déjà nette à pH₁ = 5,13, est très importante à pH₁ = 6,08, ce qui ressort d'ailleurs de l'examen du tableau XXI.

TABLEAU XXI

B. aurantiacus tingitanus type S

Culture sur milieu L₂ additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de 5 jours
A	5,13	Voile plissé, jaune orangé; liquide trouble; légère fluorescence verte.
B	5,36	Voile plissé jaune; liquide trouble; légère fluorescence verte.
C	5,53	Voile plissé, jaune citron; liquide trouble; belle fluorescence verte.
D	5,70	Voile plissé sensiblement incolore, liquide trouble; belle fluorescence verte.
E	5,79	Voile plissé jaunâtre, liquide trouble; fluorescence verte.
F	5,92	Voile plissé jaunâtre, liquide trouble; fluorescence verte.
G	6,08	Voile plissé incolore, liquide trouble; belle fluorescence verte.

2° Culture de *B. aurantiacus tingitanus* en milieu L₁.

Comme le montre sa formule le milieu synthétique L₁ ne se différencie du milieu L₂ que par l'absence de succinate d'ammonium et de glucose.

En 1935, Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs avaient déjà noté que le milieu L₁ favorise surtout la production de la fluorescence. Tandis que le milieu L₂ exalte la production de pigment jaune orangé. Le pH des milieux utilisés varie de pH = 4,70 à pH = 6,32.

Les trois types dissociés ne se développent pas à pH = 4,70 même après plusieurs jours.

Type Rb.

Le tableau XXII résume les aspects culturaux de *B. aurantiacus tingitanus* Rb.

TABLEAU XXII

B. aurantiacus tingitanus type Rb.

Cultures sur milieu L₁ additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de	
		48 heures	5 jours
A	4,70	Pas de développement apparent;	Pas de développement apparent.
B	4,98	Voile blanc mince, uni; pas de color.; liq. limpide.	Voile orangé très plissé; col. jaune orangé; liq. trouble.
C	5,36	Voile blanc légèrement plissé; col. jaune sur 2 mm.; liq. limpide.	Voile orangé plissé; col. jaune; fluor. verte; liq. trouble.
D	5,73	Voile blanc légèrement plissé; col. jaune sur 2 mm.; liq. limpide.	Voile orangé plissé; col. jaune; fluor. verte; liq. trouble.
E	5,91	Voile blanc légèrement plissé; col. jaune vert sur 2 mm.; liq. limpide.	Voile orangé plissé; col. jaune-vert; fluor. verte; liq. trouble.
F	6,03	Voile blanc peu plissé; col. jaune-vert; liq. limpide.	Voile orangé plissé; col. jaune-vert; fluor. verte; liq. trouble.
G	6,15	Voile peu plissé; col. jaune-vert; fluorescence verte; liq. limpide.	Voile jaune plissé; col. jaune-vert; fluor. verte; liq. trouble.
H	6,22	Voile blanc plissé; col. jaune-vert; fluorescence verte; liq. limpide.	Voile citrin peu plissé; belle fluor. verte; liq. trouble.
I	6,32	Voile blanc plissé; fluorescence verte très intense; liq. limpide.	Voile citrin peu plissé; fluor. verte; liq. trouble.

De pH₁ = 4,98 à pH₁ = 6,32, le voile est plissé, l'intensité du plissement, et la coloration orangé du voile diminuent lorsque le pH croît. La fluorescence apparaît à pH₁ = 5,36.

Type Ra.

De même qu'en milieu synthétique L₂, le type Ra donne en milieu L₁ des voiles lisses, jaune orange, pour un pH de l'ordre de 4,98, voiles qui deviennent blancs au milieu F (pH₁ = 6,03); la fluorescence verte apparaît dans le système C (pH₁ = 5,36) et paraît être maxima à pH₁ = 6,22.

Le tableau XXIII résume ces observations.

TABLEAU XXIII

B. aurantiacus tingitanus type Ra

Cultures sur milieu L₁ additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de	
		48 heures	5 jours
A	4,70	Pas de développement apparent.	Pas de développement apparent.
B	4,98	30 % des tubes : pas de développement apparent; 70 % : pellicule; léger trouble.	Voile lisse, jaune orangé; col. jaune orangé, sur 3 mm.
C	5,36	Voile blanc, lisse; col. jaune sur 3 mm.	Voile lisse jaune orangé; fluor. verte, avec reflets jaunes.
D	5,73	Voile blanc, lisse; fluorescence verte; léger trouble.	Voile lisse jaune; fluor. verte avec reflets jaunes
E	5,91	Voile blanc mince; fluor. verte; léger trouble.	Voile lisse jaune; fluorescence verte.
F	6,03	Voile blanc mince; fluor. verte; léger trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte.
G	6,15	Voile blanc mince; fluor. verte; léger trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte.
H	6,22	Voile blanc mince; belle fluorescence verte; léger trouble.	Voile lisse blanc; belle fluorescence verte.
I	6,32	Voile blanc mince; fluor. verte; léger trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte.

Type S.

Cultivé sur milieu synthétique L₂, *B. aurantiacus tingitanus* S montre un voile plissé, orangé ou jaune orangé de pH₁ = 4,70 à pH₁ = 5,36, le voile devient lisse et blanc à pH₁ = 5,73.

On note déjà la fluorescence verte dans le système B ($pH_1 = 4,98$), comme on peut le constater en examinant le tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

B. aurantiacus tingitanus type S.

Cultures sur milieu L_1 additionné de doses croissantes de soude.

Désignation des milieux de culture	pH des milieux de culture	Aspect des cultures âgées de	
		48 heures	5 jours
A	4,70	Pas de développement apparent.	Pas de développement apparent.
B	4,98	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile plissé orangé; fluor. verte; liq. trouble.
C	5,36	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile plissé jaune orangé; fluor. verte; liq. trouble.
D	5,73	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.
E	5,91	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.
F	6,03	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.
G	6,15	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.
H	6,22	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.
I	6,32	Pellicule; légère fluorescence verte; liq. trouble.	Voile lisse blanc; fluorescence verte; liq. trouble.

Le type S montre également une autre particularité, c'est la présence de niveaux bactériens, plus nets en milieu L_1 qu'en milieu L_2 .

On peut schématiser ainsi l'aspect d'un tube de culture: pellicule en surface, zone limpide de deux à cinq mm. de hauteur, puis zone trouble de quelques centimètres, enfin une zone plus trouble constituant la partie profonde de la colonne de liquide.

En résumé, les trois types de *B. aurantiacus tingitanus* se comportent différemment, vis-à-vis d'un même milieu.

B. aurantiacus tingitanus type Rb donne toujours des voiles plissés, *B. aurantiacus tingitanus* type Ra des voiles lisses, tandis que le type S présente aussi bien sur milieu L_1 que sur milieu L_2 des voiles plissés quand la concentration en ions OH^- est trop faible ($pH_1 = 5,73$ par exemple).

CHAPITRE VI

Essais de réversion des types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus* Remlinger et Bailly 1935

A) PASSAGE PAR L'ORGANISME DU COBAYE

Généralités

Si tous les Microbiologistes sont d'accord pour admettre l'existence possible de deux groupes de colonies, les unes lisses « S », les autres plissées et granuleuses « R », il règne une certaine contradiction lorsqu'il s'agit de reconnaître l'existence de transformations des types « S » en types « R » et des types « R » en types « S ».

De nombreux Auteurs, parmi lesquels BURNET (1925), IZAR (1926), FAVILLI (1926) estiment incontestable la transformation des types S en types R.

Par contre la transformation inverse est beaucoup plus controversée. D'autre part V. GRONCHI (1933) considère la phase S, comme propre aux Bactéries durant leur vie parasitaire, et la phase R comme propre aux Bactéries adaptées à la vie saprophytique; au contraire S. VANNI (1934) pense que la forme caractéristique du charbon est la forme R.

Certains Savants, considérant que la virulence était l'apanage d'un type déterminé, ont songé à modifier le type par passage par l'animal neuf, ou l'animal immunisé (1).

(1) P. REMLINGER et J. BAILLY n'ayant découvert aucun pouvoir pathogène à *B. aurantiacus tingitanus*.

De cette façon DAWSON (1928), SOUBE (1928) ont pu obtenir la reversion du type R en type S. Mais SPINELLI et N. FAVIA (1933) auraient fait agir en vain les sérums-anti sur la forme R de BRUCCELLA. Les Auteurs ne sont donc pas d'accord sur la transformation que peut subir la forme R en forme S, au cours du passage par l'animal neuf.

Certains Savants adoptent le schéma suivant :

$$R \rightarrow R_s \rightarrow RS \rightarrow rS \rightarrow S$$

D'autres nient la transformation de R en S au cours de ces mêmes passages.

G. MAZZETTI et N. FAVIA n'ont observé aucune transformation de S en R tandis que ZAPATERO (1934) par passages sur le Cobaye obtient la transformation du type R en type S.

S. VANNI (1934), dans ses recherches sur *B. anthracis* démontre la transformation des formes dissociées dans le sens $R \rightarrow S$, la forme R étant la forme normale du charbon.

GOYLE en 1926 aurait isolé à côté des formes R un petit nombre de colonies lisses.

« La mort des Cobayes obtenue par S. VANNI à partir des formes S peut s'expliquer par la transformation de S en R ou par la persistance d'éléments R dans les cultures S. »

G. BUONOMINI résume ainsi ses observations (1).

$$S \rightleftharpoons S_r \rightleftharpoons SR \rightleftharpoons sR \rightleftharpoons R$$

Lorsque le Savant italien a pu retrouver le Bacille typhique dans le sang, la forme R s'est présentée seule, et cela dans 100 % des cas.

G. BUONOMINI estime que les variantes S et S_r se sont fixées dans leurs caractères, les formes SR n'accusant aucune tendance à évoluer vers R.

G. MAZZETTI adopte le schéma suivant :

$$R \rightleftharpoons RS \rightleftharpoons S$$

(1) Le Savant italien admet cinq types dissociés qu'il désigne de la façon suivante : type S, type S_r , type SR, type sR, type R.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

Lorsqu'on s'adresse à *B. aurantiacus tingitanus*, le passage par l'animal est compliqué du fait que ce Germe n'est pas pathogène, ainsi que l'ont montré P. REMLINGER et J. BAILLY.

Il faut donc inoculer au Cobaye une quantité assez élevée de corps microbiens, et après quelques erreurs et quelques insuccès, j'ai adopté la technique suivante.

Les Cobayes pesant 300 grammes, reçoivent en injection intrapéritonéale 5 cm³ d'une suspension de type Rb de *B. aurantiacus tingitanus*, suspension renfermant 15 milliards de Germes au cm³. Après 24 heures, on prélève aseptiquement la sérosité péritonéale qui estensemencée dans un tube de solution de peptone à 2 %. La culture ainsi obtenue offre les caractères du type inoculé: voile plissé, orangé, liquide clair orangé. Je la désigne sous le terme de culture n° 1.

Le sang du cœur, prélevé aseptiquement etensemencé de la même façon ne montre aucune culture (1), ce qui prouve que *B. aurantiacus tingitanus* n'a pas déterminé de septicémie au cours de ces essais.

La culture N° 1 convenablement diluée est inoculée à un Cobaye neuf et fournit ainsi la culture N° 2, etc...

Résultats expérimentaux.

Des isolements pratiqués sur la culture n° 4 (4^e passage) montrent encore des colonies caractéristiques du type Rb, tandis qu'un isolement fait après le 5^e passage (culture N° 5), présente bien encore des colonies plissées (25 % seulement), mais aussi des colonies lisses (75 %).

Une de ces colonies lisses soumise à un nouvel isolement sur plaque de gélose ne donne que des colonies lisses à l'exclusion de colonies plissées. Ceci montre bien que l'absence de plissement chez les colonies lisses n'est pas due à une erreur de technique telle par exemple que le trop grand nombre de colonies sur la plaque de gelée nutritive.

En effet lorsque la distance entre les colonies est trop faible, on assiste à une diminution très importante du plissement chez le type Rb pouvant aller même jusqu'à la suppression des plis. Le microscope peut

(1) Cette remarque étant valable dans tous les cas.

Il semble donc bien qu'il y a eu à un moment donné, au cours de ces passages par l'organisme du Cobaye, une modification de *B. aurantiacus tingitanus* Rb, en *B. aurantiacus tingitanus* S. Cette modification ne fut que temporaire, ainsi que le montrent les passages par les animaux n° 6 et n° 7.

B) INFLUENCE DU TEMPS

Généralités

En 1935, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et J.-G. MARCHAL signalaient dans un isolement pratiqué sur *B. chlororaphis* type S l'apparition d'une colonie de type R. La souche *B. chlororaphis* type S était issue d'une seule plastide. A cette époque, les Auteurs n'ont pas voulu se prononcer affirmativement et déclarer que le type lisse s'était transformé en type plissé.

Recherches personnelles

Les souches bactériennes sont conservées en tubes scellés sur pommes de terre glycélinées. Les tubes renfermant ce milieu de culture sont après stérilisation étirés à la flamme (jusqu'à obtention d'un tube de 5 à 8 mm. de diamètre) puisensemencés. Quand la culture s'est bien développée (ce qui peut demander 24 heures, 2 jours ou 3 jours), le tube est scellé à la flamme (1), puis abandonné à la température du Laboratoire pendant un temps plus ou moins long.

Pour utiliser ces cultures, on trempe tout d'abord le tube de culture dans l'alcool-éther; on le laisse sécher et après en avoir flambé l'extrémité, on ouvre la culture à l'aide d'une lime stérile. On procède ensuite au réensemencement.

Des cultures de *B. aurantiacus tingitanus*, type S, ainsi traitées, m'ont donné après séjour de 4 à 5 mois en tube scellé, des cultures plissées sur pommes de terre glycélinées. Ces cultures sont donc bien différentes de celles que l'on obtient ordinairement avec le type S puisque celui-ci

(1) En raison de l'étirement préalable, le scellement de la culture ne détermine aucune élévation appréciable de température pouvant déterminer la mort des plastides.

montre une culture lisse, d'une couleur plus claire que le type Rb qui lui a une culture plissée de coloration rouge orangé sur ce milieu.

Des isolements pratiqués en partant de ces cultures m'ont donné sur gélose peptonée exclusivement des colonies de type Rb.

Pour expliquer ces faits, trois hypothèses peuvent être émises :

1° Une contamination lors de l'ensemencement ou du réensemencement des cultures. Ceci est peu vraisemblable car les types Ra, Rb et S de *B. aurantiacus tingitanus* ont toujours été manipulés séparément.

2° Lors de l'ensemencement de la souche, on a déposé plus d'une seule plastide. On aurait eu ainsi affaire à un mélange de plastides Rb et S. Or en suivant la technique habituelle du laboratoire, technique décrite en 1930 et 1931, une seule plastide a donné naissance à la culture de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY type S.

3° Il ne reste plus qu'une seule hypothèse possible celle d'une transformation d'un type lisse S en type plissé Rb sous l'influence du temps en tube scellé.

Cette transformation nécessite un laps de temps assez long et ne s'est pas produite dans les cultures réensemencées fréquemment.

C) PASSAGES EN EAU PEPTONÉE

DE pH VOISIN DE 9.

Généralités

En 1931, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et M. OLIVIER ont montré qu'il était possible de rendre limpide une culture très trouble en amenant le pH de cette culture à être égal à 10 ou 12. Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont établi que l'éclaircissement observé était dû à une hydratation des plastides invisibles au microscope, mais perceptibles encore très nettement à l'ultramicroscope.

Dans le chapitre où j'ai résumé les caractéristiques des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Rb en eau peptonée de pH variable, j'ai noté les différents aspects du voile suivant le milieu nutritif utilisé. Pour un $pH_1 = 5,83$, le voile est plissé mais il devient lisse pour des pH de l'ordre de 7.51. En même temps, l'épaisseur du voile diminue et les Bactéries envahissent toute la masse liquide.

On pourrait expliquer ces faits par une variation de l'aérobiose et une disparition des plis du voile.

Sur les conseils de M. le Professeur LASSEUR, j'ai cultivé *B. aurantiacus tingitanus* Rb sur eau peptonée à 2 % de pH voisin de 9 ($pH_1 = 8.93$ ou 8.85 suivant les expériences) afin de voir dans quelle mesure les passages répétés sur milieux de $pH = 9$ permettent la transformation du type Rb en type S.

Résultats expérimentaux.

Trois séries d'expériences ont été réalisées :

1° Dans le premier essai, les passages sont effectués tous les 4 jours ; un isolement pratiqué après le dernier passage montre seulement des colonies plissées caractéristiques du type Rb.

2° Au cours d'une seconde série d'essais, les passages sont réalisés seulement après 8 jours de culture, et à partir du 4^e passage, le voile est remplacé par une fine pellicule ; toute la masse liquide est trouble uniformément ; les cultures offrent une fluorescence verte, mais on n'observe plus de pigment orangé.

L'isolement sur boîte de PETRI effectué à partir de la culture ayant subi 4 passages à $pH = 8.93$ montre de très nombreuses colonies de type Ra (1), ce que résume le schéma suivant.

(1) Dans cette expérience, la transformation n'a donc pas atteint le type S puisqu'on s'arrête au type Ra.

TABLEAU XXVI

Culture de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb
sur eau peptonée de pH = 8.93

	eau peptonée 2 pour 100 pH = 7	
	culture témoin	
	↓	
	eau peptonée 2 pour 100 pH = 8,93	
	↓	
10-2-36	1 ^{er} passage	Voile lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
	↓	
18-2-36	2 ^{me} passage	Voile lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
	↓	
28-2-36	3 ^{me} passage	Voile mince lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
	↓	
3-3-36	4 ^{me} passage	Liquide trouble, fluorescence verte.
	↓	
	13-3-36 isolement sur gélose peptone pH = 7 → très nombreuses colonies Ra.	

3° La troisième expérience a été faite de la manière suivante :

Les passages ont lieu tous les 8 jours ; mais il s'écoule un espace de 6 mois entre le cinquième passage et l'isolement, ainsi que le montre le tableau XXVII.

TABLEAU XXVII

Culture de *B. aurantiacus tingitanus* type Rb
sur eau peptonée de pH = 8.85.

eau peptonée 2 pour 100 pH = 7	Voile plissé orangé épais Liquide clair, orangé.
↓	
eau peptonée 2 pour 100 pH = 8.85	
↓	
1 ^{er} passage	Voile lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
↓	
2 ^{me} passage	Voile lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
↓	
3 ^{me} passage	Voile lisse blanc; Liquide trouble, fluorescence verte.
↓	
4 ^{me} passage → isolement	Colonies de type Rb.
↓	
5 ^{me} passage → isolement	Nombreuses colonies Ra Quelques colonies Rb Rares colonies présentant des puits
↓	
miliue synthétique L ₂	→ voile lisse, pigment orangé.

Remarques:

- 1) Les passages ont lieu tous les huit jours.
- 2) Entre le 4^{me} et le 5^{me} passage, il s'écoule une période de 6 mois

L'isolement pratiqué sur la culture ayant subi 5 passages, présente des colonies nombreuses de type Ra, quelques colonies de type Rb et quelques rares colonies offrant des trous.

Ces trois types de colonies sont reproduits dans la planche V fig. 4, 3, 6.

En résumé, j'ai atteint la transformation du type Rb, non pas en type S, mais en type Ra avec en plus apparition d'un nouveau type.

Si cette expérience ne fait que confirmer l'influence du milieu de culture sur la forme des colonies bactériennes, elle apporte néanmoins un fait nouveau : la transformation de *B. aurantiacus tingitanus* Rb en *B. aurantiacus tingitanus* Ra.

D) CULTURE SUR GÉLOSE NUTRITIVE DE pH VARIABLE.

Généralités

En 1930, Ph. LASSEUR, J. MARCHAL et A. DUPAIX ont recherché les facteurs qui peuvent faire varier la forme des colonies, dans les conditions usuelles de l'expérimentation bactériologique. Les Auteurs ont remarqué que *B. prodigiosus* donnait, soit des colonies rondes, soit des colonies étoilées, soit enfin des colonies rondes et des colonies étoilées, selon l'épaisseur de la gelée (1 à 10 mm.), la concentration en gélose (1,5 %, 2 %, 3 %), la tension de vapeur d'eau à l'intérieur de la boîte de PÉTRI.

De façon générale, la forme des colonies de *B. prodigiosus* varie lorsque l'on modifie d'une façon ou d'une autre la concentration en eau de la gelée nutritive, c'est-à-dire lorsqu'on hâte ou retarde la dessiccation de la gelée.

L'appauvrissement du milieu en eau, limite l'expansion de la colonie qui reste ronde, petite. Si le milieu est plus riche en eau, la colonie s'agrandit, et peut émettre, suivant la quantité d'eau, des prolongements de plus en plus nombreux et de plus en plus importants donnant aux colonies un aspect étoilé.

En 1934, A. BERTHELOT, J. VALTIS et F. VAN DEINSE arrivaient à une conclusion du même ordre lorsqu'ils montraient qu'un milieu donné est capable de modifier la forme des colonies.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

La gélose employée au cours d'un premier essai est additionnée de quantités croissantes de solution normale de soude de façon que le pH du milieu soit égal à pH = 5,2, 6,2, 7,2, 8,2.

Résultats expérimentaux.

TABEAU XXVIII

Culture⁹ de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BALLY type Rb
sur gélosé de pH croissant

	pH initial des géloses nutritives	Aspect des colonies âgées de 48 heures		
		Mouvement	Coloration	Observations
A	5,2	Zone brune très plissée, entourée d'une collerette blanche peu importante.	Production maxima de corps coloré.	Diminution de la vitesse de croissance.
D	8,2	Zone brune sensiblement lisse entourée d'une collerette lisse, blanche très importante. Colonies plus grandes qu'en A, B, C.	Pigment orangé moins intense.	Pas de diminution de la vitesse de croissance.

Pour des raisons de simplifications typographiques nous ne mentionnons pas les résultats de pH = 6,2 et 7,2, les résultats obtenus étant intermédiaires entre ceux fournis par les géloses de pH = 5,2 et 8,2.

Le tableau XXVIII, dans lequel sont synthétisées les observations faites au cours de ces essais montre tout d'abord que la pigmentation des colonies décroît lorsque le pH croît. De plus la production de corps microbiens est plus faible à pH = 5,2 qu'à pH = 8,2.

L'emploi de grossissements suffisants a permis de mettre en évidence la présence d'une collerette, lisse, blanche, très réfringente dépourvue de structure (fig. 5, Pl. V). La partie centrale est brune très plissée à pH = 5,2, puis presque lisse à pH = 8,2.

La zone périphérique peu importante à pH = 5,2 est plus large chez la colonie sur gélose de pH = 8,2. C'est dans cette zone annulaire que le mouvement (1) des Bactéries est très intense, dans la partie centrale les plastides sont dépourvues de tout mouvement.

La figure 2, planche V, montre à pH = 5,2 une colonie jeune paraissant lisse. Or, comme on l'a vu la végétation à pH = 5,2 subit un retard et si l'examen des colonies avait eu lieu quelques jours plus tard, on aurait observé des colonies présentant l'aspect plissé caractéristique de *B. aurantiacus tingitanus* Rb.

En conséquence, si l'examen microscopique s'effectue trop tôt, on peut attribuer à des colonies à bord un peu lobé une structure lisse alors que ces colonies donnent, après quelques jours encore de culture, les plissements caractéristiques du type Rb.

(1) Le mouvement dans les colonies bactériennes a été signalé et étudié en 1936 par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE VII

Phénomène de Charrin et Roger

Généralités

La précipitation des Bactéries, soit par les sérums d'animaux préparés, soit par les ions à charge positive, soit même par les matières colorantes, a été longuement et depuis de nombreuses années, étudiée au Laboratoire de M. le Professeur LASSEUR.

Au cours de leurs recherches, Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs ont maintes fois noté la présence de Bactéries libres dans les systèmes agglutinants et la théorie d'ARRHENIUS et MADSEN, qui fait de l'agglutination une réaction limitée, ne leur a pas paru donner une explication suffisante des faits observés.

L'agglutination de certaines souches de collection varie, en effet, quelques fois de façon assez inattendue. Aussi, en 1935, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et N. GROSJEAN ont-ils essayé l'agglutination par les ions H^+ et Al^{+++} des suspensions des types dissociés R et S de 3 Bactéries chromogènes (*B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX 1930, *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY 1935 et *B. mesentericus niger* LUNT 1896).

A la suite de ces essais, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et N. GROSJEAN ont pu affirmer que les suspensions des types R et S sont différemment sensibles à l'action précipitante des ions à charge positive.

Enfin, la même année, les différents types dissociés de *B. chlororaphis* furent soumis à l'action précipitante d'un sérum de Lapin préparé à l'aide d'une souche non dissociée de *B. chlororaphis*. Les courbes de précipitation représentées à la page 116 du Fascicule VIII des *Travaux du Laboratoire de Microbiologie* ne sont pas superposables. C'est à ce moment que furent préparés des Lapins avec les types Ra, Rb, S de *B. aurantiacus tingitanus*.

Avant de résumer ces expériences, je vais exposer brièvement quelques-uns des Travaux parus sur la variabilité des Bactéries, en particulier ceux

qui utilisent la réaction de CHARRIN et ROGER pour différencier les types R des types S des Bactéries.

G. PETRAGNANI (1), en 1932, fait remarquer qu'il peut y avoir une dissociation plus ou moins profonde sans variations concomitantes de la morphologie des colonies.

L'existence de phénomènes de dissociation n'implique donc pas fatalement une différenciation des colonies en type R et en type S.

En 1934, MAGGIORA VERGANO fait appel non seulement à l'aspect lisse ou rugueux des colonies mais encore aux caractères de culture, fermentation des glucides, coagulation du lait, formation d'indol, action des agents physiques ou chimiques pour caractériser les formes R ou S.

La même année, Cornélia POPESCO-COMBIESCO et Eugénie SORU rappellent que si quelques fois la différenciation des formes R et S est facile, il est au contraire des cas où il devient difficile d'établir un diagnostic.

Dès 1903, SMITH et REAGH mettaient en évidence deux antigènes distincts donnant lieu à la formation de deux anticorps correspondants. Les animaux inoculés avec les souches mobiles produisaient des agglutinines pour la substance ciliaire et la substance du corps bactérien, tandis que l'inoculation des souches immobiles ne fournissait des agglutinines que pour la substance du corps bacillaire.

WEILL et FÉLIX (1917), distinguent aussi deux sortes de colonies, les colonies H à germes mobiles, auxquelles correspond l'antigène O+H et les colonies O à germes immobiles auxquelles correspond l'antigène O.

En 1921, ARKWRIGHT signale le fait suivant : le sérum anti-dysentérique-S agglutine le type S, mais a peu d'action sur le type R, inversement le sérum anti-dysentérique-R agglutine surtout les Bactéries de type R.

SCHUTZE (1921), BRUCE WHITE (1926), G. PETRAGNANI (1932), N. FAVIA (1932), HANS SCHMIDT (1933), G. BUONOMINI (1933), J. CALALB et D. CRIVAT signalent des faits analogues. En 1933, G. DADDI prépare des animaux avec diverses souches de *B. prodigiosus* obtenues à partir de différentes colonies sur gélose (colonies dont la coloration varie du blanc au vermillon, et qui sont ou lisses ou plissées). Le Savant italien a montré que toutes les souches ne sont pas également sensibles à l'action du sérum préparé avec une souche déterminée.

En 1935, P. THIBAUT montre qu'un sérum anti-shiga R agglutine non seulement le Bacille dysentérique *Shiga* R, mais des Bacilles dysentériques d'espèces voisines.

(1) Dans un article sur la « Dissociation bactérienne ».

De nombreuses recherches dues à André BOIVIN et à Lydia MESROBEANU (1935), A. DAMBOVICEANU (1930), R. SEIGNEURIN (1935), M. LISBONNE et R. SEIGNEURIN (1936) sur la charge électrique des Bactéries, montrent que la charge électrique des formes R est plus grande que celle des formes S.

Il y a donc lieu pour caractériser les types R ou S des Bactéries, de faire appel, outre l'aspect lisse ou rugueux des colonies ou à l'ensemble des caractères culturels, au phénomène de CHARRIN et ROGER.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

1° Matériel bactérien utilisé.

Au cours de ces expériences, j'ai utilisé les 3 types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY, 1935.

2° Sérums utilisés.

La réaction de CHARRIN et ROGER a été réalisée à l'aide de 3 sérums, un sérum préparé avec *B. aurantiacus tingitanus* Ra, un second avec *B. aurantiacus tingitanus* Rb, un troisième avec *B. aurantiacus tingitanus* S.

3° Milieu de culture; préparation des suspensions.

L'ensemencement sur boîtes de ROUX dans lesquelles a été répartie la gélose peptonée amenée à $\text{pH} = 7$, s'effectue de la manière suivante: 6 cm³ de suspension homogène (1) des Bactéries sont versés d'une manière aseptique sur les plaques de gelée nutritive. Par des mouvements appropriés on répartit uniformément la suspension à la surface de la gelée.

Après 40 heures de culture à la température du Laboratoire on procède à la mise en suspension des corps microbiens dans de l'eau physiologique stérile pour l'agglutination sérique.

La suspension ainsi obtenue est centrifugée, le liquide est décanté et le culot de corps microbiens remis en suspension. Cette opération est répétée trois fois, afin d'éliminer toute trace de milieu nutritif. Après ces trois lavages, on agite le dépôt microbien dans un ballon en verre Pyrex, renfermant des billes de verre Pyrex, jusqu'à ce que la suspension soit aussi homogène que possible, c'est-à-dire ne renferme que des Bactéries

(1) Renfermant environ 4 milliards de germes au cm³.

isolées. La durée de l'agitation peut varier de 20 minutes à une demi-heure, après ce laps de temps, il peut subsister encore quelques amas. C'est pour les éliminer que l'on soumet cette suspension à une légère centrifugation. Le liquide décanté, très riche en germes microbiens, est alors dilué de telle sorte qu'il renferme 8 milliards de germes au centimètre cube.

Dans une série de tubes A, B, C, D... on introduit successivement 1 cm³ de suspension (à 8 milliards de germes au cm³), puis 1 cm³ de sérum de dilution croissante. La concentration finale en Bactéries est donc amenée à 4 milliards au cm³. Chaque expérience est toujours faite en double et quelques fois même en triple exemplaire. Après avoir agité soigneusement le mélange, les systèmes sont placés à l'étuve à 37° C. En première approximation l'opacité est évaluée d'abord à l'œil puis à la loupe (1) après 4 heures de séjour à l'étuve à 37° C.

Dans ces conditions on peut évaluer la dilution limite d'agglutination et apprécier la vitesse de précipitation.

Résultats expérimentaux.

Afin de simplifier la composition typographique, sérum-Rb, sérum-Ra et sérum-S désigneront les sérums préparés respectivement avec les types Rb, Ra, S de *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY.

J'envisagerai deux parties, d'abord l'agglutination des trois types dissociés par les sérums-Rb, Ra et S normaux, puis l'action du sérum-Ra mis en contact avec les types Ra, Rb et S, celle du sérum-Rb mis en contact avec les types Ra, Rb et S et enfin celle du sérum-S mis en contact avec les types Ra, Rb et S. (Réaction de CASTELLANI.)

1° Agglutination par les sérums normaux

A) 1^{re} groupe d'expériences.

Au cours de cette première série d'expériences, diverses souches des trois types Ra, Rb et S de *B. aurantiacus tingitanus* sont soumises à l'action précipitante du sérum homologue.

Le tableau XXIX résume cet essai.

(1) Pour plus de précision et comme on le verra plus loin, l'opacité des solutions est dans certains cas mesurée au néphélo-absorptiomètre de KIPP.

TABLEAU XXIX

Agglutination de *B. aurantiacus tingitanus* type Ra; *B. aurantiacus tingitanus* type Rb;

B. aurantiacus tingitanus type S par les sérums homologues. Aspect des systèmes agglutinants.

Dilution du sérum	Sérum-Ra sur <i>B. aurant. ting.</i> Ra		Sérum-Rb sur <i>B. aurant. ting.</i> Rb		Sérum S sur		
	<i>B. aurant. ting.</i> Ra		<i>B. aurant. ting.</i> Rb		<i>B. aurant. ting.</i> S	<i>B. aurant. ting.</i> S2	<i>B. aurant. ting.</i> S3
1/100	dépôt; liq. clair.		dépôt; flocons.		dépôt; liq. clair.	dépôt; liq. clair.	dépôt; liq. clair.
1/200	dépôt; liq. clair.		dépôt; flocons.		dépôt; liq. clair.	dépôt; liq. clair.	dépôt; liq. clair.
1/400	dépôt; liq. clair.		dépôt; flocons.		dépôt; liq. clair.	dépôt; flocons	dépôt; flocons.
1/800	dépôt; liq. clair.		dépôt; flocons.		dépôt; liq. clair.	fin précipité.	dépôt; gros précipité.
1/1.600	dépôt; flocons		flocons.		dépôt; liq. clair.	très fin précipité.	fin précipité.
1/3.200	gros précipité		fins flocons		fin précipité.	homogène	homogène
1/6.400	fin précipité		fin précipité		homogène	homogène	homogène
1/12.800	homogène		homogène		homogène	homogène	homogène
1/25.600	homogène		homogène		homogène	homogène	homogène
Témoin	homogène		- homogène		homogène	homogène	homogène

La dilution limite et la vitesse d'agglutination sont différentes pour les trois types bactériens: 1/6400 pour le type Ra et le type Rb, 1/3200 pour une des souches de type S, 1/1600 pour les deux autres souches.

B) 2^e Groupe d'expériences.

Il concerne l'action du sérum-Ra, du sérum-Rb et du sérum-S sur chacun des trois types bactériens Ra, Rb et S.

TABLEAU XXX

Agglutination de *B. aurantiacus tingitanus* type Ra;
B. aurantiacus tingitanus type Rb; *B. aurantiacus tingitanus* type S,
par le sérum Ra.

Dilution du sérum	<i>B. aurant. ting. Ra</i>	<i>B. aurant. ting. Rb.</i>	<i>B. aurant. ting. S</i>
1/100	Dépôt; liquide clair.	Très fin précipité.	Gros précipité.
1/200	Dépôt; liquide clair.	Homogène	Très fin précipité.
1/400	Dépôt; liquide clair.	Homogène	Homogène.
1/800	Dépôt; gros flocons.	Homogène	Homogène.
1/1.600	Dépôt; flocons.	Homogène	Homogène.
1/3.200	Dépôt; fin précipité.	Homogène	Homogène.
1/6.400	Fin précipité.	Homogène	Homogène.
1/12.800	Homogène.	Homogène	Homogène.
1/25.600	Homogène.	Homogène	Homogène.
Témoin	Homogène.	Homogène	Homogène.

TABLEAU XXXI

Agglutination de *B. aurantiacus tingitanus* type Ra;
B. aurantiacus tingitanus type Rb; *B. aurantiacus tingitanus* type S,
par le sérum Rb.

Dilution du sérum	<i>B. aurant. ting. Ra</i>	<i>B. aurant. ting. Rb</i>	<i>B. aurant. ting. S</i>
1/100	Dépôt; gros flocons.	Dépôt; liquide clair.	Dépôt; liquide clair.
1/200	Dépôt; flocons.	Dépôt; liquide clair.	Dépôt; liquide clair.
1/400	Précipité.	Dépôt; liquide clair.	Dépôt; liquide clair.
1/800	Très fin précipité.	Dépôt; liquide clair.	Fin précipité.
1/1.600	Homogène.	Dépôt; liquide clair.	Fin précipité.
1/3.200	Homogène.	Fin précipité.	Très fin précipité.
1/6.400	Homogène.	Très fin précipité.	Homogène.
1/12.800	Homogène.	Homogène.	Homogène.
1/25.600	Homogène.	Homogène.	Homogène.
Témoin	Homogène.	Homogène.	Homogène.

TABLEAU XXXII

Agglutination de *B. aurantiacus tingitanus* type Ra;
B. aurantiacus tingitanus type Rb; *B. aurantiacus tingitanus* type S,
par le sérum S.

Dilution du sérum	<i>B. aurant. ting. Ra</i>	<i>B. aurant. ting. Rb</i>	<i>B. aurant. ting. S</i>
1/100	Dépôt; gros flocons.	Dépôt; précipité.	Dépôt; liquide clair.
1/200	Dépôt; gros flocons.	Dépôt; précipité.	Dépôt; liquide clair.
1/400	Gros précipité.	Fin précipité.	Dépôt; liquide clair.
1/800	Fin précipité.	Fin précipité.	Dépôt; liquide clair.
1/1.600	Homogène	Homogène	Fin précipité
1/3.200	Homogène	Homogène	Très fin précipité.
1/6.400	Homogène	Homogène	Homogène
1/12.800	Homogène	Homogène	Homogène
1/25.600	Homogène	Homogène	Homogène
Témoin	Homogène	Homogène	Homogène

On peut constater tout d'abord en consultant les tableaux ci-dessus que le taux limite d'agglutination est plus élevé pour le germe homologue que pour les germes hétérologues, ces derniers étant cependant agglutinés.

On peut noter ensuite que le sérum-Ra agglutine *B. aurantiacus* Ra au 1/6400, *B. aurantiacus tingitanus* Rb au 1/100 et *B. aurantiacus tingitanus* S au 1/200. De même, avec le sérum-Rb le taux limite d'agglutination pour le germe homologue étant 1/6400 il atteint 1/3200 pour le type S et 1/800 pour le type Ra. Le sérum-S agglutine les Bactéries de type S jusqu'à la dilution: 1/3200, tandis que les types Rb et Ra ne sont pas agglutinés au-delà de 1/800. Ces quelques constatations permettent d'affirmer qu'il existe entre les types Rb et S de *B. aurantiacus tingitanus* une parenté plus étroite qu'entre les types Ra et S ou Rb et Ra. On peut ajouter que le type Ra est plus éloigné du type Rb qu'il ne l'est du type S.

En expérimentant sur différentes souches (1) d'un même type dissocié, les résultats sont dans leurs grandes lignes comparables aux conclusions ci-dessus, mais il faut noter cependant, ainsi que le montre le tableau XXXIII une variation importante de l'agglutinabilité des différentes souches d'un même type bactérien.

(1) Issues d'une seule plastide.

TABLEAU

Agglutination de *B. aurantia*
Variation de l'agglutinabilité

Dilution du sérum	<i>B. aurant.</i> <i>ting. Ra₁</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. Ra₂</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. Rb₁</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. Rb₂</i>
1/100	Dépôt; liq. clair.	Dépôt; flocons.	Homogène.	Flocons.
1/200	Dépôt; liq. clair.	Dépôt; flocons.	Homogène.	Flocons.
1/400	Dépôt; flocons.	Dépôt; flocons.	Homogène.	Très fin précipité
1/800	Dép.; fin précipité.	Dépôt; gros précipité.	Homogène.	Homogène
1/1.600	Dép.; fin précipité.	Dépôt; gros précipité.	Homogène.	Homogène
1/3.200	Très fin précipité.	Fin précipité.	Homogène.	Homogène
1/6.400	Fin précipité.	Homogène.	Homogène.	Homogène
1/12.800	Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène
Témoin	Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène

Afin de vérifier ces conclusions, j'ai soumis les sérums à la réaction de CASTELLANI.

2° Réaction de CASTELLANI

TECHNIQUE

La technique employée au cours de ces expériences peut se résumer ainsi. Les corps microbiens employés pour la saturation des sérums sont traités de la même façon que ceux utilisés pour l'agglutination proprement dite, mais dans ce cas, la richesse des suspensions peut atteindre 100 à 300 milliards de germes au centimètre cube.

Le sérum est dilué au 1/25^e seulement, et à 1 volume de sérum, on ajoute 1 volume de suspension bactérienne.

Après un contact de 30 minutes, le mélange est centrifugé jusqu'à obtention d'un liquide rigoureusement limpide; la dilution du liquide décanté est donc égale au 1/50; c'est ce liquide qui, additionné d'une partie de suspension bactérienne, constituera le système de dilution le plus faible (1/100).

XXXIII

tingitanus par le sérum-Ra
vant le type et la souche utilisés.

<i>B. aurant.</i> <i>ting. S₁</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. S₂</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. S₄</i>	<i>B. aurant.</i> <i>ting. S₅</i>
Flocons.	Dépôt; liquide clair.	Fin précipité.	Flocons.
Gros précipité.	Dép.; liquide louche.	Très fin précipité	Gros précipité.
Fin précipité.	Dép.; liquide louche.	Homogène.	Très fin précipité.
Homogène.	Très fin précipité.	Homogène.	Homogène.
Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène.
Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène.
Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène.
Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène.
Homogène.	Homogène.	Homogène.	Homogène.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A) Expériences réalisées avec le sérum-Ra.

Aucun des trois types bactériens n'est agglutiné à la dilution du 1/100 par le sérum-Ra saturé par *B. aurantiacus tingitanus* Ra.

Le taux limite d'agglutination est le même pour le sérum-Ra normal et le sérum-Ra ayant été en contact avec des plastides de type Rb ou S de *B. aurantiacus tingitanus*.

B) Expériences réalisées avec le sérum-Rb.

1° La saturation du sérum-Rb par *B. aurantiacus tingitanus* Rb abaisse le taux agglutinatif du sérum au 1/100 pour le germe homologue et au 1/100 ou inférieur au 1/100 pour *B. aurantiacus tingitanus* Ra ou S.

2° Voyons maintenant, le cas du sérum-Rb saturé par les plastides de type S. Dans ce cas, pour *B. aurantiacus tingitanus* S, la dilution limite d'agglutination passe de 1/6.400 à 1/200; pour Ra et Rb elle n'atteint plus que le 1/100.

3° Si le sérum-Rb est saturé par *B. aurantiacus tingitanus* Ra, le pouvoir agglutinant passe au 1/100 pour le type Ra, mais ne varie pas sensiblement pour les types Rb et S.

C) *Expériences réalisées avec le sérum-S.*

Le sérum-S saturé par les plastides de type S de *B. aurantiacus tingitanus* n'agglutine plus les types Rb et S qu'au 1/100; la dilution limite d'agglutination reste telle qu'elle était pour le type Ra (1/1600).

Le sérum-S, après avoir été en contact avec des plastides de type Ra, voit son taux d'agglutination baisser considérablement, pour le type Ra (1/100) et au contraire rester égale à 1/800 pour le type Rb et à 1/3.200 ou 1/1600 pour le type S (suivant la souche utilisée).

La réaction de Castellani conduit donc aux mêmes conclusions que l'agglutination par les sérums normaux, puisqu'elle permet de faire deux groupes, d'une part *B. aurantiacus tingitanus* type Ra, d'autre part *B. aurantiacus tingitanus* type Rb et *B. aurantiacus tingitanus* type S.

Phénomène de Malvoz-Michaëlis

Voyons maintenant, dans quelle mesure, la précipitation par les colorants basiques pourra confirmer ou infirmer les faits ci-dessus, et permettre ainsi une différenciation des types Ra, Rb et S de *B. aurantiacus tingitanus*.

En effet, si certains Auteurs recommandent le chauffage, la précipitation par les ions à charge positive, de nombreux savants ont utilisé la trypaflavine pour caractériser les formes R ou S des Bactéries.

Historique

En 1931, ALESSANDRINI et SABATUCCI signalent l'agglutination par la trypaflavine comme étant un moyen de caractérisation des Brucines. La même année, PAMPANA utilise ce même colorant pour identifier les types R. De nombreux Auteurs ont conseillé l'emploi de cette substance chimique, ce sont: PUGNANI (1932); MULLER (1932); SPINELLI, A. SEPPILI et GUISSO (1932); G. MAZZETTI (1932); G. PETRAGNANI (1932); G. BUONOMINI (1932); S. VANNI (1933); G. BUONOMINI (1933); MAGGIORA VERGANO (1934); DI AICHELBURG et N. BOGETTI (1934); A. SEPPILI et R. VENDRAMINI (1934); V. VAGNINI (1934); A. MATTEI (1934); C. DORIA (1934); CORNELIA POPESCO-COMBESCO et Eugénie SORU (1934); OLPER LÉONE (1935); Eugénie SORU (1936); V. SERTIC et N.-A. BOULGAKOW (1936).

DI AICHELBURG U. et M. BOGETTI, après avoir utilisé la trypaflavine, font appel à la fuchsine basique pour différencier les types R des types S des Bactéries du groupe des *Bacilles dysentériques* de CASTELLANI. Dans ce mémoire, DI AICHELBURG U. rappelle que HUDDLESON avait, bien avant lui, employé la fuchsine basique dans l'étude des *Brucella*.

DI AICHELBURG U. utilise comparativement deux échantillons de fuchsine basique; la fuchsine de la « *National and Chemical Co* » lui a donné d'excellents résultats, tandis qu'avec la fuchsine de la marque GRÜBLER les résultats obtenus sont discordants.

Le Savant italien utilise des solutions récemment préparées de fuchsine basique car la conservation de ces solutions est de courte durée.

Le mélange d'une partie de solution de fuchsine et d'une partie de suspension bactérienne est placé à l'étude à 37° C. En 1935, DE MEGNI NELLO, après avoir constaté l'insuffisance de la trypaflavine dans la diagnose des types dissociés, lui substitue le rouge d'acridine, la chrysaniline et l'orangé d'acridine. Ces deux derniers colorants se comportent sensiblement de la même façon que la trypaflavine.

En 1933, Ph. LASSEUR, A. DUPAIX-LASSEUR et L. GEORGES étudièrent la fixation de 12 colorants acides ou basiques par les plastides bactériennes. L'agglutination, notée il est vrai, n'était pas le but de ce travail, dans lequel Ph. LASSEUR et ses Collaborateurs, tenant compte du pH, de la tension superficielle, du volume des corps microbiens, déterminent la quantité de colorant fixée par les plastides bactériennes en suspension dans les solutions colorantes de concentration variable.

Dans les recherches qui suivent, j'ai utilisé d'abord la fuchsine basique, puis la safranine, le rouge neutre; ces trois colorants proviennent de la firme GRÜBLER. La fuchsine GRÜBLER ne m'a pas permis, comme on va le voir dans les lignes suivantes, une différenciation des types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus*, elle m'a cependant donné des résultats constants. L'utilisation du bleu de Méthylène n'a pas été possible, les lectures étant mauvaises aux concentrations où ce colorant fournit des résultats intéressants.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

1° Préparation des suspensions bactériennes.

Le matériel bactérien utilisé dans ces expériences: *B. aurantiacus tingitanus* REMLINGER et BAILLY Types Ra, Rb, S est cultivé sur gélose peptonée et traité de la même façon que lors de l'agglutination sérique, mais l'eau physiologique stérile est remplacée par de l'eau distillée stérile; ceci dans le but d'éviter l'action stabilisante des électrolytes.

Le premier système réalisé avec chacun des colorants est examiné à la loupe afin de pouvoir se représenter le phénomène dans ses grandes lignes. Puis, dans un second système, on opère sous un volume beaucoup plus grand. Après examen à l'œil et à la loupe la mesure du trouble est faite au néphélo-absorptiomètre de KIPP.

2° Préparation des solutions de colorant.

Toutes les solutions colorantes employées sont de préparation récente (24 ou 48 heures). Le colorant est dissout dans l'eau distillée, à froid ; la solution au 1/100 sert à la préparation des solutions de concentrations inférieures par dilutions successives dans l'eau distillée stérile.

Le mode opératoire dans le premier cas (examen à l'œil aidé de la loupe) est celui que j'ai décrit dans la première partie de ce chapitre.

Voici comment on procède dans le second (mesuré au néphélo-absorptiomètre de KIPP). La suspension homogène (1) des Bactéries est diluée de telle sorte qu'un centimètre cube de suspension renferme environ 20 milliards de germes.

Dans une série de tubes A, B, C, D..., on distribue 10 cm³ de suspension homogène, puis 10 cm³ de solution colorante de concentration décroissante. Après mélange, les systèmes sont abandonnés à la température du laboratoire pendant 15 minutes, temps au bout duquel l'aspect des systèmes précipitants est noté.

Les lectures au néphélo-absorptiomètre de KIPP sont faites après 30 minutes de contact. A ce moment, on prélève aseptiquement à l'aide d'une pipette à boule stérile, environ 15 cm³ du liquide dont on veut évaluer le trouble.

« Le trouble des systèmes est mesuré à l'aide du néphélo-absorptiomètre de KIPP. Cet appareil utilise deux piles thermo-électriques ; une source de lumière incandescente les excite au travers de deux cuves à faces parallèles. Deux shunts de 50 ohms sont connectés aux bornes des piles thermo-électriques. L'un d'eux est subdivisé en 9×5 ohms et l'autre en $10 \times 0,5$ ohms. Les piles thermo-électriques et leurs shunts sont reliés en opposition sur un galvanomètre de ZERNICKE. Lorsque l'absorption du liquide dans une des cuves est plus grande que dans l'autre, le galvanomètre marque une déviation. Cette déviation est annulée en réduisant la résistance du shunt subdivisé qui agit comme potentiomètre. La lecture de ce potentiomètre donne directement l'absorption en pour cent de l'une des cuves (A), l'autre cuve étant prise comme étalon (B). »

Les suspensions sont examinées sous une épaisseur de 10 mm. L'appareil a été légèrement modifié en lui adaptant une fente réglable. De plus, il est possible d'opérer en lumière monochromatique grâce à l'emploi de filtres colorés. L'appareil ainsi équipé est d'un maniement très facile, mise

(1) Au sens bactériologique du mot.

au point rapide et la sensibilité est bien supérieure à celles qu'exigent des mesures de ce genre (1).

3° Préparation des solutions témoins.

Les systèmes précipitants, dont la concentration en matière colorante varie de 1/200 à 1/20.000, renferment encore, même après précipitation des Bactéries, une quantité notable de colorant; et dans certains tubes, la quantité de corps microbiens restant en suspension est faible.

Les expériences sont faites en triple exemplaire.

Le liquide d'une série de tubes est centrifugé, après 30 minutes de contact, jusqu'à obtention d'un liquide rigoureusement limpide, qui sert de témoin (T_1 , T_2 , T_3 ...). Les deux autres échelles de tubes, après 30 minutes de contact sont examinées comme il a été dit, puis le liquide supérieur, renfermant plus ou moins de Bactéries en suspension (suivant qu'il y a eu ou non agglutination dans le système considéré) est placé dans la cuve « A ».

Dans la cuve « B », on verse le liquide du tube témoin (de concentration correspondante: T_1 , T_2 , T_3 ...).

Cette méthode, qui fait appel à la mesure du trouble, présente sur l'examen à l'œil ou à la loupe un réel avantage. Elle permet d'abord l'établissement de courbes et substitue à une notion qualitative une notion quantitative. Elle permet d'ailleurs de déceler, comme le faisaient remarquer en 1936 Ph. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR « *la formation de petits agglutinats qui se traduit par une augmentation de l'absorption lumineuse. Les systèmes paraissant homogènes à l'œil ou à la loupe peuvent cependant présenter une opacité plus grande que celle des systèmes témoins. Il est vrai que dans ce cas, le microscope montre des plastides réunies par deux ou par quatre* ».

Résultats expérimentaux

Dans les lignes qui vont suivre, je vais relater l'action de la fuchsine basique, du rouge neutre, de la safranine. Le tableau XXXV résume dans ses grandes lignes les dilutions limites de précipitation.

(1) Travaux Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1934.

TABLEAU XXXV

Dilution limite de précipitation de *B. aurantiacus tingitanus*

Désignation du colorant	<i>B. aurantiacus</i> <i>tingitanus</i> Ra	<i>B. aurantiacus</i> <i>tingitanus</i> Rb	<i>B. aurantiacus</i> <i>tingitanus</i> S
Fuchsine basique.	1/4.000 1/3.000 1/4.000	1/4.000 1/3.000 1/3.000	1/4.000 1/3.000 1/3.000
Rouge neutre	1/16.000 1/24.000	1/6.000 1/12.000	1/24.000 1/20.000
Safranine	1/12.000 1/8.000	1/8.000 1/8.000	1/8.000 1/8.000

A) *Fuchsine basique.*

Bien qu'ayant donné des résultats constants, la fuchsine basique, au cours des trois séries d'expériences ne m'a pas permis de différencier les types Ra, Rb, S de *B. aurantiacus tingitanus* l'un de l'autre.

Le taux limite d'agglutination, pas plus que l'aspect des courbes de précipitation ne décèlent de différences.

En effet, les courbes de précipitation (Fig. 1) (ainsi que le montre leur examen) sont semblables, presque même superposables, dans la première série d'expériences. Si dans une autre série d'essais, les types Ra et Rb se différencient du type S, ce n'est que dans la première partie des courbes seulement.

La fuchsine basique ne permet donc pas de différencier les trois types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus*.

B) *Rouge neutre.*

Les résultats obtenus avec ce colorant sont discordants, mais le taux limite d'agglutination pour le type Rb est suffisamment différent de ceux des types Ra et S pour que l'on puisse considérer *B. aurantiacus tingitanus* Rb, comme moins sensible à l'action précipitante du rouge neutre, que les deux autres types bactériens qui se comportent sensiblement de la même façon.

Les courbes de précipitation reproduites ci-dessous (Fig. 2) fournissent des résultats analogues. Les Bactéries de type Rb se montrent peu agglutinables. *B. aurantiacus tingitanus* Ra est très sensible à l'action précipitante du colorant, dans la zone des fortes concentrations; la courbe

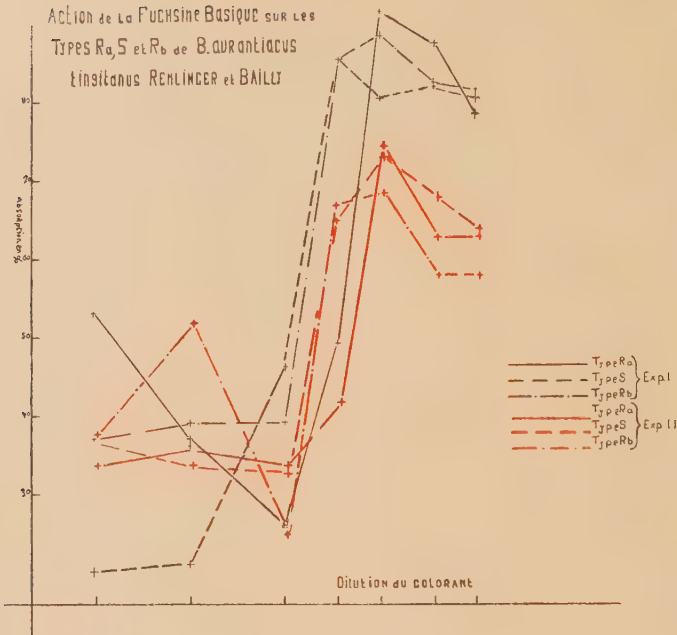


Fig. 1

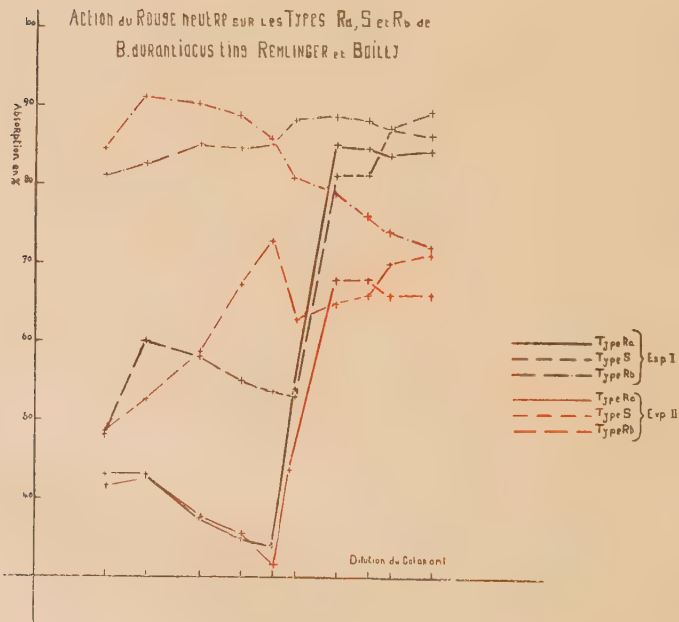


Fig. 2

d'absorption du type S, quoique irrégulière, reste intermédiaire entre celles des deux autres types (Ra et Rb).

C) Safranine.

Dans la détermination du taux limite d'agglutination, avec la safranine, nous retrouvons des résultats concordants, il est vrai, mais identiques, pour les trois types bactériens (Fig. 3). Le taux limite d'agglutination ne peut donc pas, dans ce cas, servir à différencier les types Rb, Ra, S de *B. aurantiacus tingitani*us.

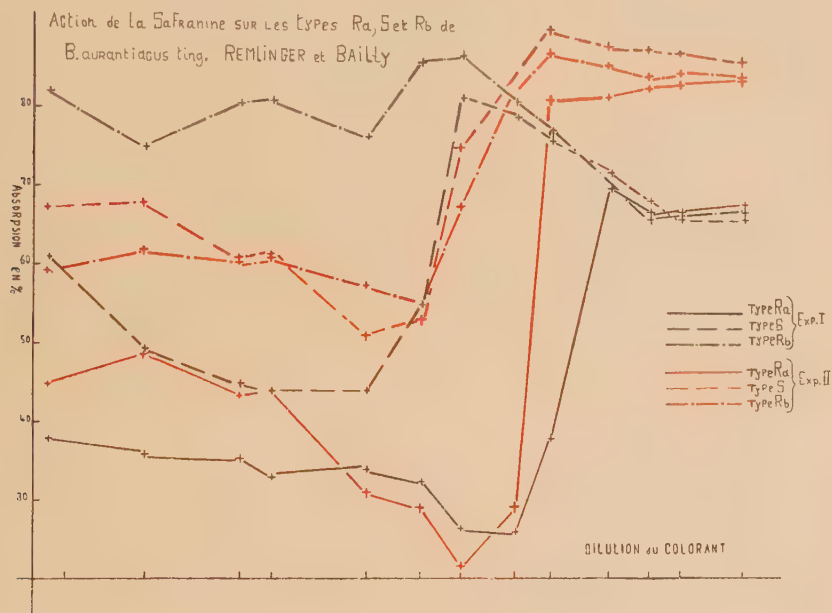


Fig. 3

Les courbes de précipitation, quoique variant légèrement d'une expérience à l'autre, permettent cependant de séparer nettement *B. aurantiacus tingitani*us Ra du groupe: type Ra, type S.

En résumé, le phénomène de MALVOZ-MICHAËLIS, ne confirme pas les résultats obtenus avec le phénomène de CHARRIN et ROGER.

Si le Rouge neutre et la Safranine permettent de rapprocher *B. aurantiacus tingitani*us Ra de *B. aurantiacus tingitani*us S, la fuchsine basique ne peut servir à différencier les types Ra, Rb et S de *B. aurantiacus tingitani*us REMLINGER et BAILLY, 1935.

Conclusions générales

1° De l'étude comparative des caractères morphologiques et culturaux des différentes espèces bactériennes relevées dans la littérature, on peut déduire que la création d'une espèce nouvelle par P. REMLINGER et J. BAILLY était justifiée pour désigner le germe chromogène isolé des eaux de TANGER.

2° L'addition de taurocholate de soude à la gélose nutritive se traduit par un essaimage de colonies filles, petites autour d'une colonie mère plus grande. Les types Ra et S de *B. aurantiacus tingitanus* sont plus sensibles que *B. aurantiacus tingitanus* Rb. La présence d'un disque de papier filtre dans le couvercle des boîtes de PÉTRI, diminue l'importance de la tension de vapeur d'eau à l'intérieur de la boîte. De cette façon le dispositif annule l'action du taurocholate de soude.

a) Les substances tensio-actives (glycocholate de soude et taurocholate de soude) ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des 3 types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus*. Le taurocholate de soude ou le glycocholate de soude ajoutés à une solution peptonée à la dose de 0,025, 0,50 ou 1 %, sont sans action sur la végétation de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, par contre ils exaltent la fonction chromogène.

b) Le taurocholate de soude ne détermine aucune modification sensible de l'aspect et de la coloration des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Rb. En présence de glycocholate de soude, le voile des cultures de *B. aurantiacus tingitanus* Rb en eau peptonée est de plus en plus plissé, à mesure que croît la concentration en sel biliaire.

c) *B. aurantiacus tingitanus* type S, subit sous l'action du taurocholate de soude et du glycocholate de soude les modifications suivantes : voiles plissés et production plus importante de pigment orangé.

3° La dose infertilisante d'acide phénique est la même pour les types Ra et S (0 gr. 150 %), le type Rb étant plus résistant (0 gr. 200 %).

Les cultures de *B. aurantiacus tingitanus* type S sont incolores à la concentration de 0 gr. 050 %; *B. aurantiacus tingitanus* Ra ne produit plus de pigment jaune, mais seulement le pigment fluorescent vert à la concentration de 0 gr. 025 %. Le séjour dans les milieux de concentration 0 gr. 275 % tue les Bactéries de type Ra, Rb et S après 7 jours de contact.

4° a) Lorsqu'on cultive *B. aurantiacus tingitanus* Rb en solution peptonée à 2 % additionnée de quantités croissantes de soude, le voile plissé dans les milieux acides ($pH_1 = 5,83$) devient lisse, s'amincit jusqu'à disparaître dans les milieux alcalins ($pH_1 = 9,04$), tandis que le liquide de clair devient trouble. Les milieux acides sont favorables à la production de pigment orangé, les cultures en milieu alcalins sont fluorescentes vertes.

b) Avec *B. aurantiacus tingitanus* S le voile reste lisse de $pH_1 = 5,83$ à $pH_1 = 9,04$. La végétation est plus intense en milieu acide qu'en milieu alcalin. A $pH_1 = 5,83$, la Bactérie secrète un corps coloré jaunâtre peu intense, à $pH_1 = 7,77$ un pigment jaune vert; à $pH_1 = 8$ on n'observe plus que la fluorescence verte, qui disparaît à $pH_1 = 9,04$.

5° *B. aurantiacus tingitanus* Ra, Rb ou S tend à alcaliniser les milieux cultureux quand le pH initial est inférieur à 8, et à l'acidifier quand le pH initial est supérieur à 8. Quand le pH initial varie entre 5,96 et 8, le pH de la zone supérieure diffère nettement de celui de la zone inférieure pour le type S.

Chez *B. aurantiacus tingitanus* Rb, dans la zone des pH acides, il existe une différence considérable entre le pH de la zone supérieure et celui de la zone inférieure dans les cultures jeunes. La différence s'atténue pour les cultures âgées de 8 jours.

6° Au cours des passages par l'organisme du Cobaye, il y a eu une modification de *B. aurantiacus tingitanus* Rb en *B. aurantiacus tingitanus* S, mais modification temporaire.

7° Sous l'influence du temps en tubes scellés, *B. aurantiacus tingitanus* S s'est transformé en *B. aurantiacus tingitanus* Rb.

8° Le passage de *B. aurantiacus tingitanus* Rb en eau peptonée de pH

voisin de 9 confirme l'influence du milieu de culture sur la forme des colonies bactériennes. Au cours de ces essais *B. aurantiacus tingitanus* Rb s'est transformé en *B. aurantiacus tingitanus* Ra.

9° La culture de *B. aurantiacus tingitanus* Rb sur gélose de pH = 8,2 met en évidence une zone annulaire très importante mince, sans structure, où les Bactéries sont animées de mouvements très importants.

10° L'agglutination par les sérums de Lapin préparés avec *B. aurantiacus tingitanus* Ra, Rb ou S et la réaction de CASTELLANI permet de faire un groupe type Rb type S différent du type Ra.

11° Phénomène de MALVOZ-MICHAËLIS: La fuchsine basique et la safranine ne permettent pas de différencier les types dissociés de *B. aurantiacus tingitanus*. Le rouge neutre permet de rapprocher *B. aurantiacus tingitanus* Ra de *B. aurantiacus tingitanus* S; *B. aurantiacus tingitanus* Rb est très peu précipitable par ce colorant.

Vu:

Nancy, le 25 octobre 1937.

Le Président de thèse,

Ph. LASSEUR.

VU ET APPROUVÉ:

Nancy, le 26 octobre 1937.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

PASTUREAU.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

Nancy, le 26 octobre 1937.

Le Recteur de l'Académie,

BRUNTZ.

Président du Conseil de l'Université

Index bibliographique

- DI AICHELBURG (U.) et BOGETTI (M.). — *Ricerche sulla dissociazione batterica nel gruppo dei Bacilli meta dissenterici*. (Castellani) (Boll. de Soe. Siero. Milanese; F. IV, 1934.)
- DI AICHELBURG (U.). — *L'agglutinazione aspecifica con la fusina basica nella dissociazione batterica*. (Giornale di Batteriologia e Immuenologia, vol. XIV, 1935).
- BERGEY (D.-H.). — *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins Company Baltimore, 1923.
- BERTHELOT (A.), VALTIS (J.) et VAN DEINSE (F.). — *De l'influence de la composition chimique du milieu de culture sur la morphologie des colonies du Bacille tuberculeux*. (C. R. Soc. Biol., T. CXV, 1934.)
- BIDZINSKI. — *Contribution à l'étude de l'action bactéricide des sels de cuivre*.
- BUONOMINI (G.). — *Recherche des variations dans les cultures d'Eberth Gaffky*. (Bol. del. sez. Ital. del. Soc. intern. di Microbiol. F. X., 1932.)
- BUONOMINI (G.). — *Il fenomeno della variazione ricercato su 28 ceppi di Bacillo di Eberth-Gaffky*. (Studi della facoltà Medica Senese. F. 3. 1933.)
- BUONOMINI (G.). — *L'influence du passage par un organisme animal sur les variantes « S » et « R » du Bacille typhique*. (Boll. del. sez. Ital. Soc. intern. di Microb. F. XI, 1934.)
- BUONOMINI (G.). — *La variation en général*, 1932.
- BUONOMINI (G.). — *La variabilità del B. pyocyaneus Gessard.* (Bol. del. Istituto sieroterapico Milanese, F. VII, 1934.)
- BURNET. — *Action d'entraînement entre races et espèces microbiennes*. (Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 1925.)
- CALALB (G.) et CRIVAT (D.). — *Les variantes S et R du Bacille de Shiga et leurs propriétés antigéniques*. (C. R. Soc. biol., T. CXXIII, 1936.)
- CONDREA (P.). — *Contribution à l'étude des variétés « Smooth » et « Rough » du Bacille tétanique*. (C. R. Soc. biol., T. CVII, 1931.)
- DADDI (G.). — (Boll. Ist. siero. Milanese, Vol. 11, 1932.)
- DADDI (G.). — (Boll. Ist. siero. Milanese, Vol. 12, 1933.)
- DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie générale*. (Paris, Masson, 1898.)
- DAMBOVICEANU (A.). — (C. R. Soc. Biol., t. CXXIII, 1930.)
- DOPTER (Ch.) et ALI MUSTAFA. — *Isolement des colonies R et S d'une culture de Bacille de Shiga par l'action lytique du Bactériophage*. (C. R. Soc. Biol., T. CXXIII, 1936.)

- DUPAIX (A.). — *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix, 1930. *Etude morphologique et biologique. Recherches sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger.* (Paris, Le François, 1933.)
- EISENBERG (J.). — *Bacteriologische Diagnostik.* (Hamburg und Leipzig, Verlag, von Leopold Voss, 1891.)
- FABICKI (J.). — *Contribution à l'étude des vaccins.* (Thèse pharmacie, Nancy, 1923.)
- FAVIA (N.). — *Delle Variazioni microbiche.* (Rev. ann. Igiene, F. 8, 1932.)
- FAVIA (N.). — *Etude sur la dissociation de quelques souches de Bacilles tuberculeux non virulents.* (Boll. del. sez. Ital., 1934.)
- HADLEY (Ph.). — *Microbic dissociation, the instability of bacterial species with special reference to active dissociation and transmissible autolyses.* (Journ. of. Infec. dis., Vol. 40, n° 1, 1927.)
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — *Considérations générales sur le mécanisme de l'agglutination sérique des microbes.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. II, 1929, pp. 7-34.)
- LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.), DUPAIX (A.). — *Modifications temporaires, modifications durables observées chez les Bactéries.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. III, 1930.)
- LASSEUR (Ph.), OLIVIER (M.), DUPAIX (A.) et MAGUITOT (C.). — *Relation entre le pH des milieux de culture et le pouvoir chromogène de B. caryocyaneus Beijerinck-Dupaix.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. III, 1930, pp. 67-74.)
- LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.-G.) et DUPAIX (A.). — *Nouveau dispositif réduisant les causes d'erreur dans l'obtention des cultures à partir d'une seule plastide.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. IV, 1931, pp. 95-97.)
- LASSEUR (Ph.), DOMBRAY (P.) et DUPAIX (A.). — *Relation entre la concentration en ions H⁺ des milieux de culture, la végétation et la chromogénèse bactérienne.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. IV, 1931, pp. 13-30.)
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — *Variation de quelques paramètres dans l'agglutination sérique des Bactéries.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. V, 1932, pp. 161-192.)
- LASSEUR (Ph.) FRIBOURG (R.) et GROJEAN (M.). — *Cultures de quelques Bactéries chromogènes en milieux synthétiques additionnés d'indicateurs.* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. V, 1932, pp. 125-136.)
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX (A.) et GEORGES (L.). — *Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des Bactéries cultivées en milieu synthétique et en solution peptonée.* (Archiv. für Mikrobiologie, 1932.)
- LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.-G.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et RENAUX (M.-A.). — *Observations sur le mécanisme de Charrin et Roger, 39^e mémoire. La théorie de Madsen et Arrhenius peut elle être appliquée à l'agglutination?* (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VI, 1933, pp. 145-162.)

- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX-LASSEUR (A.). — *Etude comparative de trois agglutinines*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VII, 1934.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et RENAUX (M.-A.). — *Action de la température sur l'agglutinine-B. pyocyaneus, l'agglutinine-B. chlororaphis et l'agglutinine-B. caryocyaneus*. (Trav. Lab. Fac. Pharm. Nancy, F. VII, 1934, pp. 219-221.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et RENAUX (M.-A.). — *Variation de l'opacité des suspensions bactériennes en fonction du pH et de la nature des solutions modificatrices de la réaction du milieu*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VII, 1934.)
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX-LASSEUR (A.). — *Entraînement des plastides hétérologues dans l'agglutination homologue*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VII, 1934.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.). — *Colonies R et colonies S chez B. mesentericus niger*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VI, 1934, pp. 61-67.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.). — *Colonies R et Colonies S chez B. chlororaphis*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VI, 1934, pp. 69-71.)
- LASSEUR (Ph.) et SIRGUEY (H.). — *Influence du pH sur la chromogénèse de B. mesentericus niger*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VII, 1934, pp. 57-59.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et GROSJEAN (N.). — *Agglutination des types R et S par les ions H^+ et Al^{+++}* . (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VIII, 1935, pp. 109-117.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et MARCHAL (J.-G.). — *Etude de la formation des colonies à partir d'une seule plastide*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VIII, 1935, pp. 9-39.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et BABOU (G.). — *Observations sur B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly, 1935 (1^{er} mémoire)*. (Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, F. VIII, 1935, pp. 41-52.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), SIRGUEY (H.) et FERRY (F.). — *Observations sur la chromogénèse de B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly, 1935 (2^e mémoire)*. (Trav. Lab. Fac. Pharm. Nancy, F. VIII, 1935, pp. 53-73.)
- LASSEUR (Ph.), MARION (C.) et BABOU (G.). — *Influence des ions H^+ sur l'aspect des cultures de B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly, 1935 type Rb, S et Ra en eau peptonée*. (F. IX, Trav. Lab. Microb. 1936, pp. 13-21.)
- LASSEUR (Ph.), MARION (C.) et GROSJEAN (N.). — *Variation du pH dans les cultures en eau peptonée de B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly, 1935 type Rb*. (F. IX, Trav. Lab. Microb., 1936, pp. 23-25.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et MARION (C.). — *Influence du pH sur l'aspect des cultures en milieux synthétiques de B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly, 1935*. (F. IX, Trav. Lab. Microb. 1936., pp. 27-34.)

- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et MARION (C.). — *Influence du passage par l'organisme du Cobaye sur la variation de B. aurantiacus tingitanus type « Rb »* Remlinger et Bailly. (Trav. Lab. Microb., F. IX, 1936, pp. 77-81.)
- LASSEUR (Ph.) et MARION (C.). — *Influence du temps sur la transformation des types « R » en « S »*. (Trav. Lab. Microb., F. IX, 1936, pp. 83-84.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et MARION (C.). — *Etude de l'agglutination des différents types de B. aurantiacus tingitanus, d'après la détermination de la dilution limite d'agglutination*. (Trav. Lab. Microb., F. IX, 1936, pp. 109-122.)
- LASSEUR (Ph.) et MARION (C.). — *Action des substances tensio-actives sur les cultures de B. aurantiacus tingitanus Remlinger et Bailly et de B. caryocyaneus Beijerinck-Dupaix*. (Trav. Lab. Microb., F. X, 1937, pp. 30-41.)
- LASSEUR (Ph.) et MARION (C.). — *Aspects des colonies de B. aurantiacus tingitanus type Rb sur géloses de pH différents*. (Trav. Lab. Microb., F. X, 1937, pp. 61-64.)
- LASSEUR (Ph.) et MARION (C.). — *Influence du passage sur eau peptonée de pH = 8,93 sur la forme des colonies de B. aurantiacus tingitanus type Rb*. (Trav. Lab. Microb., F. X, 1937, pp. 65-68.)
- LASSEUR (Ph.), MARION (C.) et GEORGES (H.). — *Etude du mouvement dans les colonies de B. aurantiacus tingitanus type Rb*. (Trav. Lab. Microb., F. X, 1937, pp. 75-76.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et MARION (C.). — *Précipitation comparative des types Ra, Rb et S de B. aurantiacus tingitanus et des types Rb et S de B. caryocyaneus par trois colorants*. (Trav. Lab. Microb., F. X, 1937, pp. 103-117.)
- MADSEN et SCHMIDT (S.). — Ann. Inst. Pasteur, T. 40, 1926.
- MALVOZ (E.). — *Recherches sur l'agglutination du B. Typhosus par des substances chimiques*. (Ann. Inst. Pasteur, T. XI, p. 582, 1897.)
- MATTEI (A.). — *Studi sulla fase R dei batteri del gruppo tifo paratifi*. (Atti dell' istituto d'igiene, Padova, 1934.)
- MATZUSCHITA (T.). — *Bacteriologische Diagnostik*. (Fischer, Jena, 1902.)
- MAZZETTI (G.). — *Contribution à la connaissance des phénomènes de dissociation chez le Bacille du charbon*. (Com. fatta alla R. acad. fisiocritici, Siena, 1932.)
- MAZZETTI (G.). — *La cultura alternata in brodo acido pH 5,5 e alcalino pH 8,3 e sua importanza come incitante la dissociazione microbia*. (Com. fatta alla R. acad. Fisiocritici Siena, 1932.)
- MAZZETTI (G.). — *Tipi dissociati di un germe cromogeno saprofita*. (Atti dell' acad. Fisiocritici Siena, 1932.)
- MIGULA (W.). — *System der Bakterien. Spezielle Systematik der Bakterien*. (Fischer, Jena, Bd. II, 1900.)
- MINOUX (M.). — Thèse pharmacie, Nancy, 1927.
- NEPVEUX (F.). — Thèse pharmacie, Nancy, 1920.
- PALGEN (W.-B.). — Thèse pharmacie, Nancy, 1925.

- PETRAGNANI (G.). — *La dissociation bactérienne*. (Relation présentée au 4^e Congrès italien de Microbiologie de Milan. Boll. del. sez. del. Soc. Intern. di Microb., F. X, 1932.)
- PETRAGNANI (G.). — *La migration à travers la bougie filtrante comme excitant des phénomènes de dissociation*. (Boll. del. sez. Ital. di Microb., F. X, 1932.)
- REMLINGER (P.) et BAILLY (J.). — *Maroc Médical*, n° 150, 1935.
- REMLINGER (P.) et BAILLY (J.). — C. R. Soc. Biol., T. CXIX, pp. 246-247.
- ROLIN (M.). — Thèse pharmacie, Nancy, 1929.
- SEIGNEURIN (R.). — Thèse pharmacie, Montpellier, 1935.
- SEPPILI (A.) et VENDRAMINI (R.). — Boll. dell. istituto sieroterapico Milanese, F. V, 1934.
- SERRA (J.-P.). — *Pouvoir bactéricide des matières colorantes dérivées du triphénylméthane*, (Thèse doctorat ès sciences Nancy, 1932.)
- SERTIC (V.) et BOULGAKOW (N.-A.). — *Sur la sensibilité des souches d'Eberthella typhi au bactériophage en relation avec les caractères antigéniques*. (C. R. Soc. biol., T. CXXII, 1936.)
- SERTIC (V.) et BOULGAKOW (N.-A.). — *L'agglutination par la trypaflavine des Salmonella de structure antigénique flagellaire non spécifique*. (C. R. Soc. Biol., T. CXXIII, 1936.)
- SERTIC (V.) et BOULGAKOW (N.-A.). — *Reversion par acidification de l'agglutination par la trypaflavine*. (C. R. Soc. Biol., T. CXXIV, 1937.)
- SORU (E.). — *La déshydrogénase des formes S et R de B. coli*. (C. R. Soc. Biol., T. CXXI, 1936.)
- SPINELLI et FAVIA (N.). — *Essai de réversion « in vitro » de la phase « R » à la phase « S » dans le groupe des « Brucelles »*. (Boll. del. sez. Ital. Soc. intern. Microb., F. IX, 1933.)
- STETTENHEIMER (L.). — *Verhandlungen der Phys. Med. Gesell. zu Würzburg, N. F.* (Bd. XLII, p. 141-220, 1913.)
- STETTENHEIMER (L.). — *Variations studien in der gruppe der Fluorescentes Verhandlungen der Phys. Med.* (Gesellschaft zu Würzburg, N. F., Bd. XLII, 1913.)
- THIBAUT (P.) et BRAUNBERGER (J.). — *Variation antigénique S et R du Bacille de Shiga*. (C. R. Soc. Biol., T. CXX, 1935.)
-

Table des Matières

INTRODUCTION.	9
PREMIÈRE PARTIE	
CHAPITRE PREMIER	
Historique.	13
CHAPITRE II	
Nécessité d'une espèce nouvelle.	19
CHAPITRE III	
Influence de la tension superficielle sur le tableau de la vie de <i>B. aurantiacus tingitanus</i>	27
CHAPITRE IV	
Action de l'acide phénique sur les types Ra, Rb, S de <i>B. aurantiacus tingitanus</i>	37
CHAPITRE V	
Influence de la concentration en ions H ⁺ sur l'aspect des cultures de <i>B. aurantiacus tingitanus</i>	50
CHAPITRE VI	
Essais de réversion des types dissociés de <i>B. aurantiacus tingitanus</i> REMLINGER et BAILLY, 1935.	73
DEUXIÈME PARTIE	
CHAPITRE VII	
1° Phénomène de CHARRIN et ROGER.	87
2° Phénomène de MALVOZ-MICHAELIS.	97
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	105
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	109

PLANCHES

PLANCHE I

B. aurantiacus tingitanus REMLINGER et BAILLY 1935, type S

Modification de la forme d'une colonie de type S en fonction du temps.

(Gross. 1 $\times$ 18)

Fig. 1: Colonie âgée de 24 heures.

Fig. 2: Colonie âgée de 48 heures.

Fig. 3: Colonie âgée de 72 heures.

Fig. 4: Colonie âgée de 6 jours.

Différents aspects présentés par la bordure des colonies de type S et Ra

Fig. 5: Colonie de type Ra présentant des sillons (gross. 1 $\times$ 116).

Fig. 6: Colonie de type S finement granuleuse (gross. 1 $\times$ 116).

Fig. 7: Colonie obtenue à la faveur d'un film d'eau (gross.: 1 $\times$ 80).

Différentes variétés de colonies de type S

Fig. 8: Colonie âgée de 3 jours.

Fig. 9: Colonie âgée de 5 jours.

Fig. 10: Colonie âgée de 6 jours.

PLANCHE I

B. aurantiacus tingitanus REMLINGER et BAILLY 1935, type S

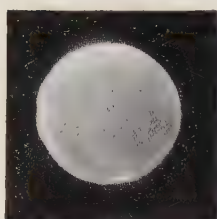


Fig. 1

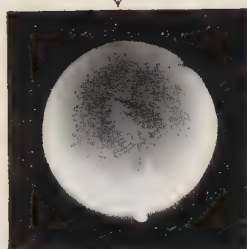


Fig. 2

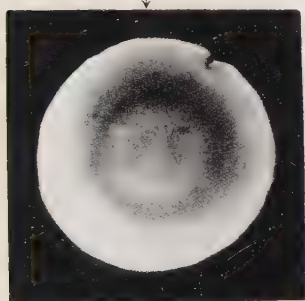


Fig. 3

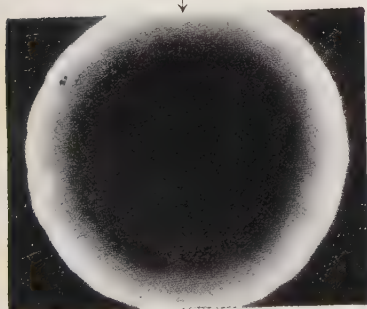


Fig. 4

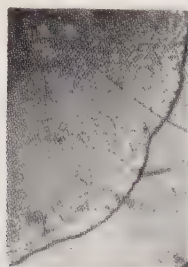


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

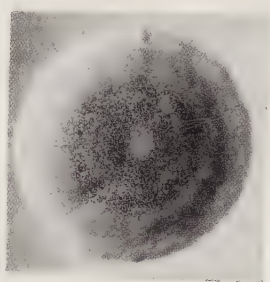


Fig. 8

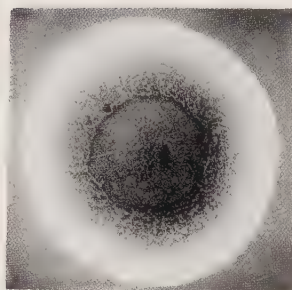


Fig. 9

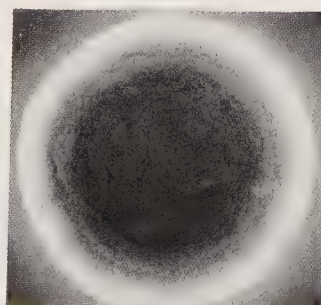


Fig. 10

PLANCHE II

B. aurantiacus tingitanus type Ra

Modification de la forme d'une colonie de type Ra en fonction du temps.

(Gross, 1 $\times$ 18)

Fig. 2: Colonie âgée de 24 heures.

Fig. 3: Colonie âgée de 48 heures.

Fig. 4: Colonie âgée de 4 jours.

Fig. 5: Colonie âgée de 10 jours.

Deux nouveaux aspects de colonies de type Rb

(Gross, 1 $\times$ 18.)

Fig. 6: Colonie âgée de 30 heures (type Rb₁).

Fig. 7: Colonie âgée de 30 heures présentant de nombreux trous (type Rb₁).

Autres aspects de colonies de type Ra

Fig. 9: Colonie âgée de 3 jours.

Fig. 10: Colonie âgée de 5 jours.

Evolution d'une colonie de type Ra cultivée en cellule.

Fig. 11: Formation de colonies secondaires par migration des plastides
(Gross, 1 $\times$ 18.)

Fig. 12: Formation de colonies secondaires par migration des plastides
(Gross, 1 $\times$ 80.)

Fig. 13: Colonie âgée de 3 jours (Gross, 1 $\times$ 18.)

Multiplication des Bactéries de type Ra

(Gross, 1 $\times$ 380.)

Fig. 1: a: t = 0; b: t = 25'; c: t = 30'; d: t = 45'; e: t = 60';
f: t = 75'; g: t = 105'; h: t = 120'.

Fig. 14: a: t = 0; b: t = 15'; c: t = 30'; d: t = 45'; e: t = 60';
f: t = 75'; g: t = 105'; h: t = 120'.

Fig. 15: a: t = 0; b: t = 30'; c: t = 45'; d: t = 60'; e: t = 75'.

Multiplication des plastides de type S

Fig. 8: Multiplication des plastides de type S. (Gross, 1 $\times$ 380.)

PLANCHE II

B. aurantiacus tingitanus type Ra

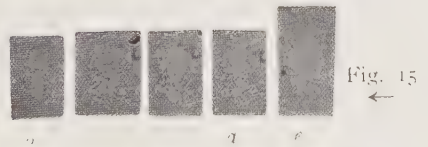
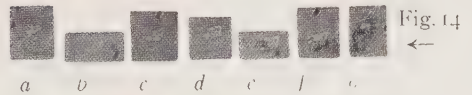
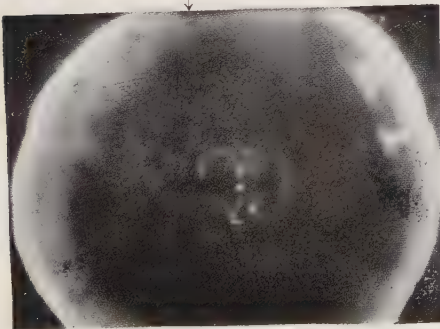
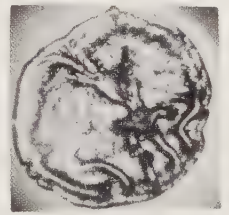
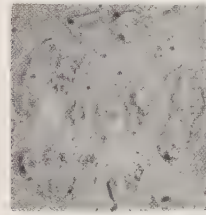
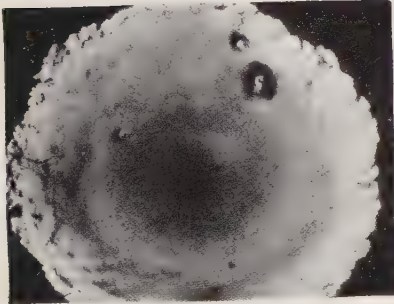
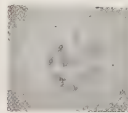
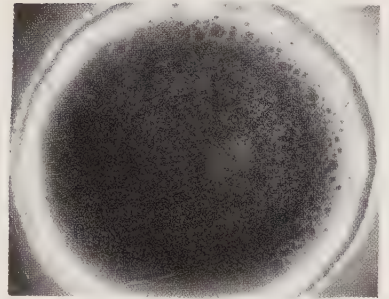
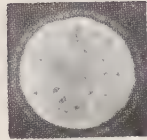
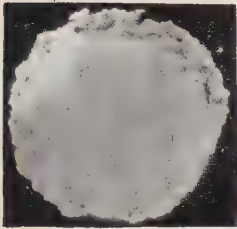
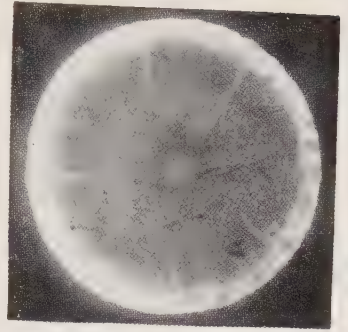
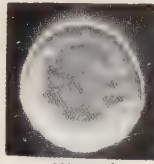
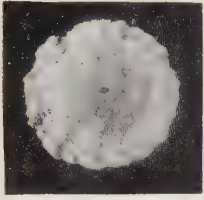
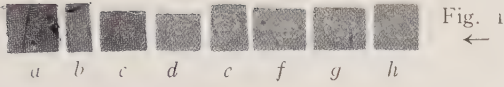


PLANCHE III

B. aurant'acus tingitanus type Rb

Modification de la forme des colonies de type Rb en fonction du temps

(Gross. 1 $\times$ 18.)

Type Rb₁ :

Fig. 1: Colonie âgée de 18 heures.

Fig. 2: Colonie âgée de 30 heures.

Fig. 3: Colonie âgée de 36 heures.

Fig. 4: Colonie âgée de 4 jours.

Fig. 5: Colonie âgée de 6 jours

Type Rb₂ :

Fig. 6: Colonie âgée de 48 heures

Fig. 7: Colonie âgée de 64 heures.

Fig. 8: Colonie âgée de 3 jours

Fig. 9: Colonie âgée de 6 jours

Type Rb₃ :

Fig. 10: Colonie âgée de 18 heures.

Fig. 11: Colonie âgée de 30 heures.

Fig. 12: Colonie âgée de 48 heures.

Fig. 13: Colonie âgée de 3 jours.

Fig. 14: Colonie âgée de 4 jours.

PLANCHE III

B. aurantiacus tingitanus type Rb



Fig. 1

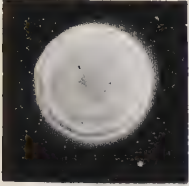


Fig. 2

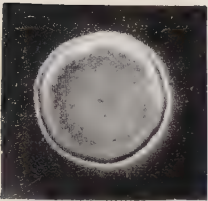


Fig. 3

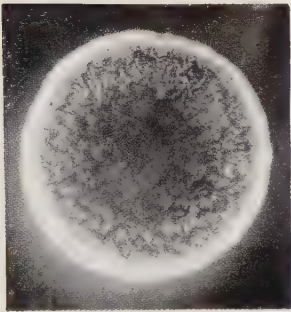


Fig. 4

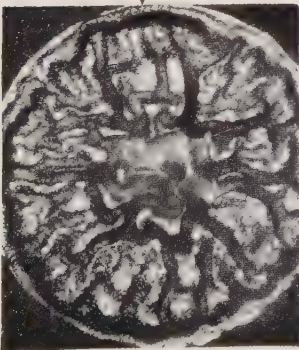


Fig. 5

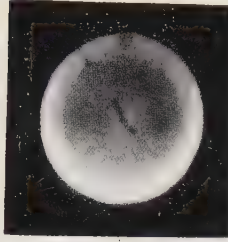


Fig. 6

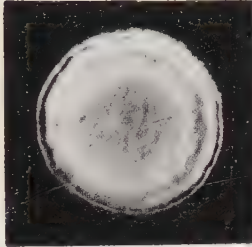


Fig. 7

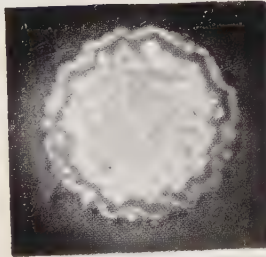


Fig. 8

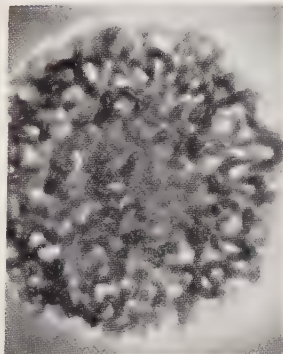


Fig. 9

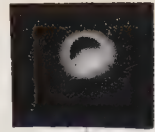


Fig. 10

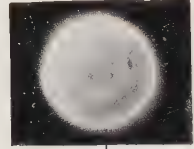


Fig. 11

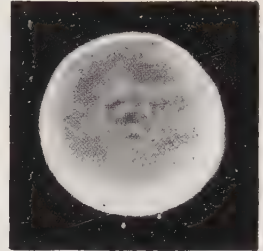


Fig. 12

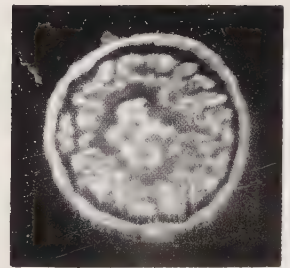


Fig. 13

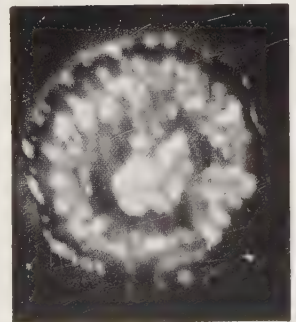


Fig. 14

PLANCHE IV

B. aurantiacus tingitanus type Ra, type Rb et type S

- Fig. 1. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* S, sur gélose additionnée de taurocholate (1 ‰), âgée de 3 jours. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 2. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, sur gélose additionnée de taurocholate (0,50 ‰), âgée de 3 jours, le couvercle de la boîte de Pétri ayant été muni d'un disque de papier buvard. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 3. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, sur gélose additionnée de taurocholate (0,5 ‰), âgée de 3 jours, le couvercle de la boîte de Pétri ayant été muni d'un disque de papier buvard. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 4. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, sur gélose additionnée de taurocholate (0,50 ‰), le couvercle de la boîte de Pétri ayant été muni d'un disque de papier buvard. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 5. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Ra, sur gélose additionnée de taurocholate (0,5 ‰), âgée de 3 jours. (Gross.: 1 × 21.)
- Fig. 6. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Rb, ayant subi 5 passages sur gélose additionnée de taurocholate (0,5 ‰). (Gross. 1 × 21.)
-

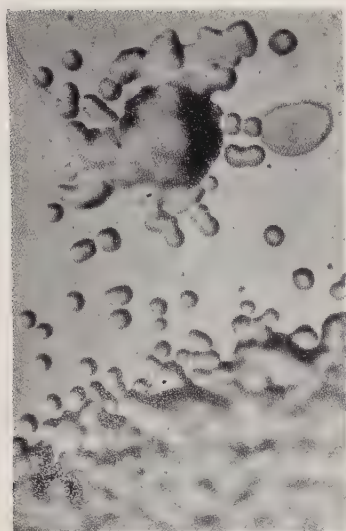


Fig. 1

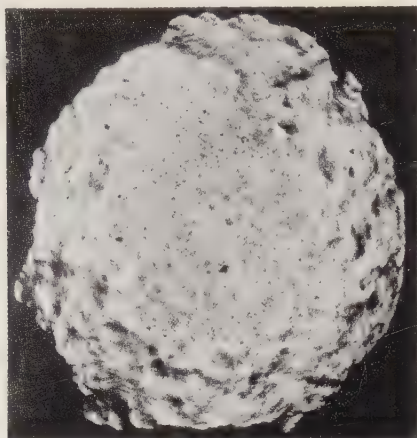


Fig. 2

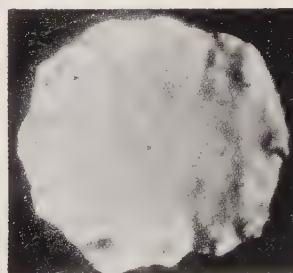


Fig. 3

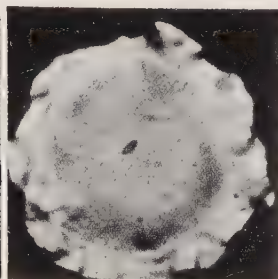


Fig. 4

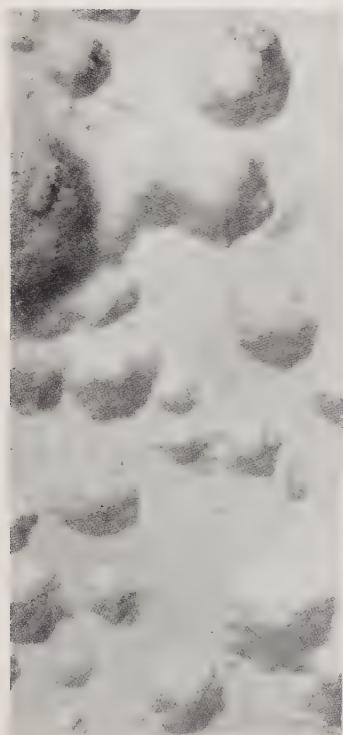


Fig. 5

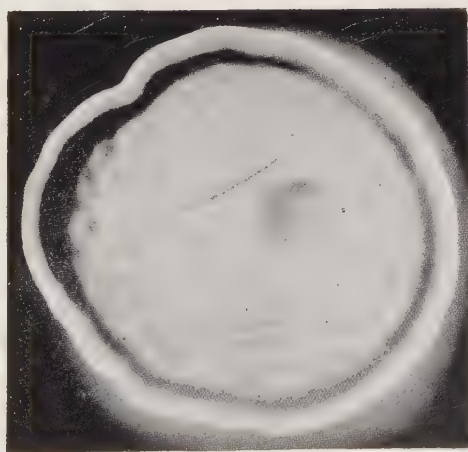


Fig. 6

PLANCHE V

B. aurantiacus tingitanus type Rb et type S

Fig. 1. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* S, sur gélose à 2 %, âgée de 3 jours. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 2. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Rb, sur gélose de pH = 5, âgée de 2 jours. (Gross.: 1×59 .)

Fig. 3. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Rb (ayant subi 5 passages en eau peptonée de pH = 9), sur gélose de pH = 7. (Gross.: 1×59 .)

Fig. 4. — Colonie Ra (sur gélose de pH = 7) issue de *B. aurantiacus tingitanus* Rb ayant subi 5 passages en eau peptonée de pH = 9. (Gross.: 1×21 .)

Fig. 5. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Rb sur gélose de pH = 7, âgée de 2 jours. (Gross.: 1×59 .)

Fig. 6. — Colonie de *B. aurantiacus tingitanus* Rb (ayant subi 5 passages en eau peptonée de pH = 9), sur gélose de pH = 7, âgée de 3 jours. (Gross. 1×21 .)

PLANCHE V

B. aurantiacus tingitanus type Rb et type S



Fig 1



Fig.2

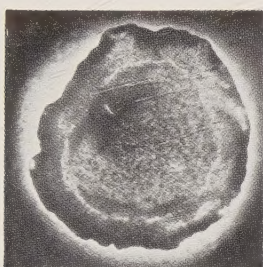


Fig 3

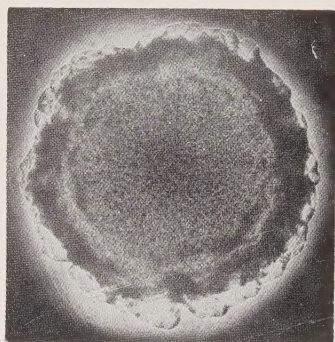


Fig. 4

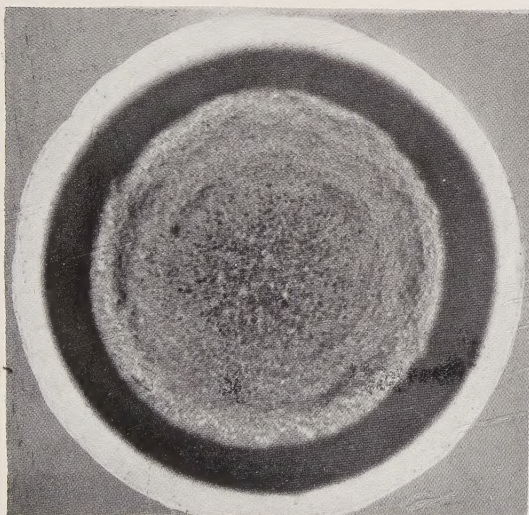


Fig. 5

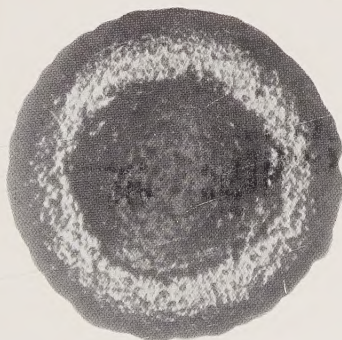


Fig. 6

